

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
- DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. A. J. RIEGGER -
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ASSOZIATION DES QT_c-INTERVALLS UND ANDERER
EKG-PARAMETER
MIT POLYMORPHISMEN IM ANKYRIN B GEN
IN DER MONICA-AUGSBURG-POPULATION
VERGlichen MIT POLYMORPHISMEN
IM ANKYRIN B GEN
IN EINEM HOCHRISIKOKOLLEKTIV**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Iris Berger

2008

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
- DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. A. J. RIEGGER -
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ASSOZIATION DES QT_c-INTERVALLS UND ANDERER
EKG-PARAMETER
MIT POLYMORPHISMEN IM ANKYRIN B GEN
IN DER MONICA-AUGSBURG-POPULATION
VERGlichen MIT POLYMORPHISMEN
IM ANKYRIN B GEN
IN EINEM HOCHRISIKOKOLLEKTIV**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Iris Berger

2008

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Andreas Jeron
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Richard Warth
Tag der mündlichen Prüfung:	1. September 2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	7
2 Methoden	15
2.1 Überblick.....	15
2.2 Populationen.....	17
2.2.1 MONICA-Augsburg-Population.....	17
2.2.2 Hochrisikokollektiv.....	19
2.2.3 Erstellung der Datenbank für das Hochrisikokollektiv	22
2.3 Isolierung und Aufarbeitung humaner DNS.....	24
2.4 Suche nach Polymorphismen im Ankyrin B Gen	25
2.4.1 Pipettieransatz	25
2.4.2 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	28
2.4.3 Allelische Diskriminierung.....	31
2.5 Statistische Grundlagen.....	39
2.5.1 Genetische Statistik.....	39
2.5.2 Statistische Analyse	42
2.5.3 Software.....	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Überblick.....	45
3.2 LD-Struktur des Ankyrin B Gens	45
3.3 Ergebnisse MONICA-Augsburg-Population.....	47
3.3.1 QTc-Zeit	47
3.3.2 QT-Dispersion	53
3.3.3 LVESD	54
3.3.4 LVEDD.....	57
3.3.5 Sokolov-Index	57
3.3.6 Allelfrequenzen und Haplotypen.....	57
3.3.7 ANK2_4447: Quartile	60
3.4 Ergebnisse Hochrisikokollektiv: „cases and controls“	62
3.4.1 Vergleich mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	63
3.4.2 Verteilung der Allele	64
3.4.3 Assoziation zum ICD	67
3.4.4 Allelfrequenzen	68
4 Diskussion	69
5 Literaturverzeichnis	75

6	Anhang	78
6.1	Materialien	78
6.1.1	Hilfsmittel	78
6.1.2	Geräte	78
6.1.3	Chemikalien	79
6.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	80
6.2.1	Abbildungen	80
6.2.2	Tabellen	80
6.3	Assays	81
6.4	Liste der Abkürzungen	81
6.5	URLs	82
7	Lebenslauf	83
8	Danksagung	84
9	Erklärung	86

1 Einleitung

In der Bundesrepublik Deutschland versterben Jahr für Jahr Tausende von Menschen an Krankheiten des Herzkreislaufsystems. Im Jahre 2005 waren rund 367.000 Menschen davon betroffen.¹

48% der Todesfälle sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen und insbesondere chronisch ischämische Herzerkrankungen, wie die stabile koronare Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt, liegen mit 43% in der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen an erster Stelle. Demzufolge verstarben im Jahre 2005 fast 81.000 Menschen an einer chronisch ischämischen Herzkrankheit, etwa 61.000 an einem akuten Myokardinfarkt und fast 48.000 Menschen an einer Herzinsuffizienz.¹ Aufgrund der hohen Inzidenz kommt daher den ischämischen Herzerkrankungen eine große medizinische und gesundheitspolitische Bedeutung zu.

Ein Grossteil der Patienten mit bekannter ischämischer Herzerkrankung verstirbt letztendlich an ventrikulären Arrhythmien. In den meisten Fällen führt die Ischämie zu ventrikulären Tachykardien, die wiederum schnell zu Kreislaufkollaps und Kammerflimmern übergehen können.² So stellt die ventrikuläre Arrhythmie z.B. unter den Patienten mit koronarer Herzerkrankung mit 84% die führende Todesursache dar.³ Unter den Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erleiden, versterben etwa 38% plötzlich, d.h. innerhalb der ersten Stunde nach Beschwerdebeginn.⁴⁻⁷ Diese Zahl der an plötzlichem Herztod verstorbenen Menschen blieb in den letzten drei Jahrzehnten konstant.²

Die individuelle Prädisposition, eine ischämie-induzierte ventrikuläre Arrhythmie zu entwickeln, wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Zu diesen zählen Alter, Geschlecht, linksventrikuläre Funktion, die Lokalisation des ischämischen Myokards, die Blutversorgung durch Kollateralen, der Elektrolytspiegel, die Rasse und auch der genetische Hintergrund.² Doch es sind nicht nur Personen mit bekannter koronarer Herzkrankheit (KHK) vom plötzlichen Herztod betroffen, sondern zu einem kleineren Teil auch scheinbar gesunde Menschen, also Personen aus der Normalbevölkerung, unter diesen auch Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene. Die Ursache vieler solcher Todesfälle liegt in einem angeborenen sogenannten Long-QT-Syndrom (LQTS) begründet.⁸ Das Long-QT-Syndrom wird charakterisiert durch eine Verlängerung des QT-Intervalls im Oberflächen-EKG (Definition und Normwerte für QT-Dauer S. 18/Kapitel 2.2.1) und kann in zwei vornehmlich klinische Kategorien unterteilt werden: erworbene und vererbte Long-QT-Syndrome.⁹ Das QT-Intervall stellt die Zeit dar, die die Herzventrikel für die elektrische Repolarisation benötigen, und wird vom Beginn des QRS-Komplexes bis zum Ende der T-Welle gemessen.⁸

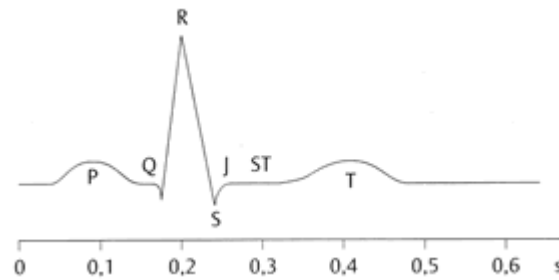


Abbildung 1: EKG-Kurve¹⁰

Erklärung: Zu sehen ist eine P-Welle, welche die Erregungsausbreitung in den Vorhöfen des Herzens widerspiegelt, gefolgt vom QRS-Komplex (aus Q-Zacke, R-Zacke und S-Zacke), der die Erregungsausbreitung in den Herzkammern kennzeichnet. Während der ST-Strecke sind die Kammern vollständig depolarisiert, wohingegen die T-Strecke die Erregungsrückbildung in den Kammern darstellt.¹⁰

Hierbei wird die erworbene Form des Long-QT-Syndroms hervorgerufen durch eine Therapie mit Medikamenten, die in keinem Zusammenhang mit einer kardialen Dysfunktion stehen, wie z.B. bestimmte Antihistaminika, bestimmte Antipsychotika und Antibiotika. Doch sogar gewisse Antiarrhythmika können Patienten anfällig für letale Arrhythmien machen. Ebenso können erworbene Formen des LQTS aus anderen Rhythmusstörungen, aus kardialer Ischämie und aus einer Reihe von Kardiomyopathien entstehen.⁹ Im Gegensatz dazu stellt das angeborene LQTS eine genetische Erkrankung dar.⁸

Vererbte Formen des LQTS sind überwiegend autosomal dominant und selten autosomal rezessiv. Typischerweise autosomal dominant ist das Romano-Ward-Syndrom, wohingegen das Jervell-Lange-Nielsen Syndrom autosomal rezessiv ist und immer mit einer Innenohrschwerhörigkeit oder komplettem Hörverlust einhergeht.⁹ Letzteres beruht auf einer homozygoten Mutation im KCNQ1 bzw. KCNE1 Gen.⁸

Es gibt mehrere Formen von angeborenem LQTS, von denen die meisten auf einem Defekt in einem Ionenkanal beruhen.⁸ Diese Ionenkanäle sind neben bestimmten kardialen Proteinen, einschließlich der dazugehörigen Untereinheiten, für eine regelrechte Erregungsausbreitung im Herzen zuständig.⁹ Mutationen in den jeweiligen kardialen Ionenkanälen, die an der Erregungsbildung und Erregungsleitung am Herzen beteiligt sind, führen zu Fehlfunktionen. Diese Fehlfunktionen verursachen eine Verlängerung der Repolarisationsphase des Aktionspotentials in Herzmuskelzellen und dadurch die Verlängerung der QTc-Zeit im Oberflächen-EKG.¹¹

Den Zusammenhang zwischen LQTS und defekten Ionenkanälen entdeckten im Jahre 1995 Mark Keating und Kollegen, welche zusätzlich herausfanden, dass es sich meist um defekte Natrium- und Kaliumkanäle handelt.⁸ Dementsprechend werden die verschiedenen Formen von Long-QT-Syndrom je nach Art des defekten Ionenkanals voneinander unterschieden.

Curran et al. machten die Entdeckung, dass ein Defekt im Gen KCNH2 (früher: HERG), welches für den kardialen Kaliumkanal I_{Kr} („rapid inward rectifier“) kodiert, für das LQT2 (Long-QT-Syndrom 2) verantwortlich ist. Denn diese Mutation führt zu einer Funktionseinschränkung des Ionenkanals und somit zu einer abnormal langen Repolarisation.⁸

Sodann wurden weitere Mutationen in Genen, die für Ionenkanäle kodieren, gefunden: Wang et al. identifizierten ein zweites Gen, das SCN5A, welches für einen Natriumkanal im Herzen kodiert und im Falle einer Mutation zum LQT3 führt. Letzteres ist anders als das LQT2 nicht mit einem Funktionsverlust, sondern mit einer Zunahme der Funktion des Natriumkanals vergesellschaftet.⁸ Ein Funktionsverlust würde zu einem verminderten Natriumeinstrom in die Zelle führen.⁹ Das klinische Erscheinungsbild wird als Brugada-Syndrom bezeichnet.⁸ Dieses stellt ein arrhythmisches Syndrom dar, das charakterisiert ist durch einen Rechtsschenkelblock und eine ST-Hebung im EKG. Außerdem spielen ventrikuläre Tachyarrhythmien eine Rolle, die letztlich oft zum plötzlichen Herztod führen.⁹ Das Long-QT-Syndrom vom Typ 1 beruht auf einer Mutation im Gen KCNQ1 (früher: KVLQT1). Dieses Gen kodiert für den I_{Ks} („slow inward rectifier“), einen der wichtigsten Kaliumkanäle im Herzen.⁸

Seltenere Formen wie LQT5 und LQT6 liegen in Genmutationen begründet, die für Untereinheiten von Kaliumkanälen kodieren.⁸

Die erste Form von Long-QT-Syndrom, dessen Ursache nicht in einer Mutation in einem Gen, das für einen Ionenkanal verschlüsselt, besteht, ist das LQT4. Denn dieses wird verursacht durch eine Mutation in dem für das Protein Ankyrin B (auch: Ankyrin 2) kodierenden Gen.⁸

Subtype of LQTS	Chromosome	Gene	Current
LQT1	11	KCNQ1	I_{Ks} α - subunit
LQT2	7	KCNH2	I_{Kr} α - subunit
LQT3	3	SCN5A	I_{Na} α - subunit
LQT4	4	Ankyrin B	Unknown
LQT5	21	KCNE1	I_{Ks} β - subunit
LQT6	21	KCNE2	I_{Kr} β - subunit
LQT7 (Andersen's)	17	KCNJ2	I_{K1}

Tabelle 1: Verschiedene LQTS, Genompositionen, defekte Gene und betroffene Ionenkanäle

Die Bezeichnung „Long-QT 4 Syndrom“ wird jedoch häufig durch den Ausdruck „Ankyrin B Syndrom“ ersetzt, da es nicht bei jedem Individuum mit einer zu Funktionsverlust führenden Variante tatsächlich zu einer Verlängerung des QT-Intervalls kommt.¹²

Denn trotz des gleichen genetischen Defekts kann die Expressivität, d.h. die unterschiedliche Ausprägung im Phänotyp, variieren. Folglich entwickelt ein gewisser Prozentsatz an Individuen die Erkrankung nicht, obwohl er die Veranlagung dazu, also das defekte Gen, trägt. Viele Faktoren beeinflussen die Wahrscheinlichkeit, ob sich der Phänotyp entwickelt und in welcher Ausprägung.¹³

Ankyrins stellen eine Familie von Adapterproteinen dar, deren Funktion darin liegt, die Lokalisation von strukturell unterschiedlichen membranassoziierten und zytosolischen Proteinen an spezielle Membrandomänen zu koordinieren.¹²

Es gibt drei Ankyringene, nämlich ANK1, ANK2 und ANK3. ANK1 kodiert für sogenannte Ankyrin-R Polypeptide („R“ steht für „restricted distribution“), die in Erythrozyten, Neuronen und im Skelettmuskel exprimiert werden. ANK2 kodiert für Ankyrin B Polypeptide („B“ steht für „broad distribution“), welche sowohl im Herzen als auch in Thymus und Gehirn vorkommen. Ankyrin G Polypeptide („G“ bedeutet „giant“ bzw. „general distribution“) befinden sich in Gehirn, Niere, Skelettmuskel und im Herzen. Sie werden von ANK3 kodiert.¹²

Ankyrin besteht aus einer Membranbindedomäne (MBD), die trotz ihres Namens nicht direkt mit der Membran interagiert (es gibt bisher keine Daten, die dafür sprechen würden), sondern mit Transportern, die mit der Plasmamembran assoziiert sind, und mit Ionenkanälen, d.h. z.B. mit der Natrium-Kalium-ATPase (Abkürzung: Na/K ATPase), dem Natrium-Calcium-Austauscher (Abkürzung: NCX1) und Anionenaustauschern. Eine weitere Domäne wird „spectrin-binding domain“ genannt. Sie hat die Funktion, Membranproteine mit dem Zytoskelett zu verbinden, und umfasst etwa 60kD.

Die Bedeutung der sogenannten „death domain“ für die Funktion der verschiedenen Ankyrins ist weitgehend unbekannt; womöglich spielt sie in der Interaktion mit anderen „death domains“ eine Rolle. Bezüglich des Ankyrin B ist deren Bedeutung jedoch sowieso vernachlässigbar.

Die Domäne am C-Terminus ist diejenige, die sich innerhalb der drei Ankyrin-Polypeptide am meisten unterscheidet.¹²

Ankyrin B ist ein Submembranprotein, das ca. 220kD umfasst und die Funktion besitzt, bestimmte Intramembranproteine, wie z.B. Ionenkanäle und Austauscherpumpen, zu verankern und mit diesen zu interagieren.¹⁴

Die Funktion des Ankyrin B in der Herzmuskelzelle besteht darin, dass es sowohl an die Natrium-Kalium-ATPase als auch an den Natrium-Calcium-Austauscher und den Inositol-1,4,5-Trisphosphatrezeptor (Abkürzung: InsP₃R) bindet, und dadurch an der Erregungsrückbildung im Herzen beteiligt ist.¹⁵

Denn eine Herzmuskelzelle reguliert exakt ihren Calciumspiegel: Ein Calciumeinstrom führt zur Kontraktion der Zelle und folglich zum Schlagen des Herzens. Das eingeströmte Calcium wird durch den NCX1 über die Zellmembran hinausbefördert, der ausströmende Calciumionen gegen einströmende Natriumionen austauscht. Das Natrium wird durch die Na/K ATPase aus der Zelle befördert. Das Protein Ankyrin B bindet an den NCX1 und an die Na/K ATPase und bildet mit diesen einen Komplex, wodurch deren genaues Zusammenspiel ermöglicht wird.

Darüberhinaus bindet Ankyrin B an ein viertes Protein, den InsP_3R . Diese vier Proteine bilden gemeinsam einen Multiproteinkomplex, der in den transversalen Tubulus (auch: T-Tubulus) eingebettet ist, eine Einstülpung der Plasmamembran, welche die elektrische Erregung von der Zelloberfläche ins Zellinnere weiterleitet.

Ein mutantes Ankyrin B verliert jedoch seine Fähigkeit an die anderen drei Proteine zu binden. Dies führt dazu, dass die Calciumregulation im Herzen verloren geht. Eine Bindung an das Ankyrin B ist wichtig, damit die Funktion des NCX1 mit der Na/K ATPase koordiniert wird, um das Calcium aus der Zelle zu entfernen.¹⁵

Eine reduzierte Expression oder veränderte Aktivität des Ankyrin B beeinflusst die Expression und Lokalisation der Na/K ATPase und des NCX1. So wird der Natrium-Calcium-Austausch über das Sarkolemm reduziert, was zu erhöhten Calciumkonzentrationen im sarkoplasmatischen Retikulum führt. Unter katecholaminerger Stimulation können diese Ereignisse in Kardiomyozyten Nachdepolarisationen und Extrasystolen auslösen.¹²

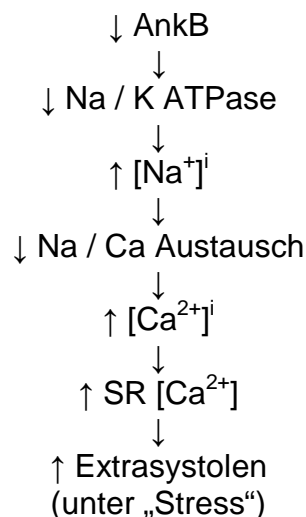


Abbildung 2: Mechanismus bei veränderter Aktivität des Ankyrin B

Erläuterung: $[\text{Na}^+]_i$: Natriumeinstrom, $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Calciumeinstrom, $[\text{Ca}^{2+}]$: Calciumkonzentration

Peter J. Mohler et al. fanden heraus, dass Mäuse, die heterozygot sind für eine Mutation im Ankyrin B, eine Arrhythmie entfalten, die derjenigen beim Menschen ähnlich ist.¹⁶

Dementsprechend zeigen Menschen mit LQT4 und AnkB^{+/-} Mäuse signifikante Ähnlichkeiten im kardialen Phänotyp. Bei den AnkB^{+/-} Mäusen wurde eine Bradykardie mit einem Puls von 515 ± 49 b.p.m. festgestellt, verglichen mit 641 ± 31 b.p.m bei Wildtypmäusen. Außerdem zeigten diese Mäuse starke Pulsschwankungen, assoziiert mit Episoden von abrupter Sinusverlangsamung, und intermittierende isorhythmische atrioventrikuläre Dissoziationen, die ähnlich den Rhythmusstörungen waren, wie sie bei menschlichen LQT4 Patienten vorkommen.

Interessanterweise war bei den AnkB^{+/-} Mäusen das QTc signifikant verlängert von $25 \pm 1,0$ ms auf $30 \pm 1,1$ ms, was auf eine verzögerte Leitung und/oder eine verzögerte Repolarisation zurückzuführen ist.¹⁶

Da sich ein plötzlicher Herztod bei Menschen mit der E1425G Mutation (eine Mutation im Ankyrin B, die zu einem Verlust der Funktion führt) nach physischer Anstrengung und emotionalem Stress ereignete, versuchten Peter J. Mohler et al. diese Faktoren nachzuahmen, indem sie den Mäusen unter körperlicher Anstrengung Adrenalin injizierten. Die Mäuse reagierten auf dramatische Weise: Zwei von 14 AnkB^{+/-} Mäusen haben für 3-10s nach der Anstrengung nicht angesprochen (waren „unresponsive“), 8 von 14 Mäusen starben. Bei keiner Wildtypmaus war dies der Fall (0 von 6). Die Mäuse mit körperlicher Anstrengung zeigten zum Teil eine reverse Polarität des QRS-Komplexes (2 Mäuse) und einen AV-Block zweiten Grades (eine P-Welle ohne QRS-Komplex bei 11 Mäusen). Bei zwei Mäusen, die unter körperlicher Anstrengung mit einer Adrenalininjektion versehen wurden, wurde eine unmittelbar dem Tode vorausgehende, verlängerte, polymorphe ventrikuläre Arrhythmie aufgezeichnet. Die anderen sechs Mäuse, die ebenfalls starben (unter körperlicher Anstrengung kombiniert mit Adrenalin), wiesen multiple kurze Episoden (1-2s) einer polymorphen ventrikulären Arrhythmie innerhalb 0-2 min. vor dem Tod auf. Im EKG der Wildtypmäuse wurden keine arrhythmischen Episoden aufgezeichnet, weder unter Anstrengung noch unter Anstrengung kombiniert mit Adrenalin.

Wie bereits beschrieben ist Ankyrin B notwendig für eine normal Expression des Natrium-Calcium-Austauschers, der Natrium-Kalium-ATPase und des Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptors in neonatalen Kardiomyozyten. Die E1425G Mutation, die bei Menschen eine klinische Arrhythmie hervorruft, hebt diese Aktivität auf.

Unter diesen Gesichtspunkten zeigte sich bei einer Untersuchung des elektrischen Verhaltens und der Ca²⁺ Dynamiken in isolierten Herzzellen von adulten AnkB^{+/-} Mäusen ein signifikanter Anstieg im Spitzen [Ca²⁺]_i Spiegel in allen Potentialen.

Bei einem anderen Versuch zeigte sich, dass nach akuter Applikation von Isoproterenol, das eine Stressbedingung simulieren sollte, die Aktionspotentiale von AnkB^{+/-} Herzzellen

spontane Extrasystolen entwickelten. Sowohl Nachdepolarisationen als auch frühe Nachdepolarisationen, wie sie in AnkB^{+/-} Zellen beobachtet wurden, führten zu Extrasystolen. Dieser Zusammenhang lässt die Vermutung zu, dass bei Menschen mit der E1425G Mutation ein erhöhter Calciumeinstrom in die Zelle womöglich zu diesen (frühen) Nachdepolarisationen und Extrasystolen beiträgt, die wiederum zu jenen letalen Arrhythmien führen.¹⁶

Um der Frage nachzugehen, inwieweit genetische Faktoren Einfluss nehmen auf die Inzidenz von Herzrhythmusstörungen, wurden verschiedene Gene untersucht und ca. 180 Mutationen in den Genen KCNQ1, HERG, SCN5A, KCNE1 und KCNE2 gefunden, welche für α - oder β -Untereinheiten in Ionenkanälen kodieren.^{17,18}

So gelang es Busjahn et al. anhand von Linkage-Untersuchungen an Zwillingen (ohne LQT-Syndrom) zu zeigen, dass die QTc-Dauer im Oberflächen-EKG mit dem KCNQ1-Lokus gekoppelt ist.¹⁹ Dies beweist, dass auch in der Normalbevölkerung die Repolarisationsdauer u.a. durch LQT-Gene genetisch beeinflusst wird.

Dagegen ist unklar, ob und inwiefern Polymorphismen in diesen Genen die Repolarisationsdauer und die Häufigkeit von ventrikulären Arrhythmien bei Patienten mit einer KHK sowie in der Normalbevölkerung beeinflussen.

Für die verschiedenen Long-QT-Syndrome wurden meist defekte Ionenkanäle als Ursache beschrieben. Das LQT4 ist das erste Long-QT-Syndrom, dessen Ursache in einem defekten Strukturprotein begründet liegt, nämlich dem Ankyrin B.

Außer der Identifizierung des Ankyrin B Gens ist über dieses Protein bislang wenig bekannt.

Ziel der Arbeit

Da insbesondere über die Auswirkungen des Ankyrin B Gens auf die Repolarisation, Herzmorphologie und linksventrikuläre Funktion in der Normalbevölkerung noch wenig bekannt ist, ist es Ziel dieser Arbeit, mögliche Veränderungen herauszufinden.

Es werden die kodierenden Abschnitte des Ankyrin B Gens in der MONICA-Augsburg Population (MONICA = Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) hinsichtlich des Vorhandenseins von Einzelbasenaustauschen, sogenannten „Single Nucleotide Polymorphisms“ (**SNPs**), untersucht. Die MONICA-Augsburg-Population stellt eine repräsentative Stichprobe aus der Normalbevölkerung dar, bei der keine strukturelle Herzerkrankung vorliegt (S. 17/Kapitel 2.2.1).

Außerdem wird das Ankyrin B Gen in einem Hochrisikokollektiv untersucht, das aus Patienten besteht, die eine koronare Herzkrankheit (KHK) oder eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) haben und in der Vorgeschichte einen ICD („implantable cardioverter defibrillator“) bekommen haben. Als Kontrollgruppe zum Hochrisikokollektiv dient ein Kollektiv aus Patienten mit KHK, die keinen Defibrillator bekommen haben.

Ziel des Vorhabens ist es, eine Assoziation von Polymorphismen im Ankyrin B Gen mit einer Verlängerung des QTc-Intervalls und anderen EKG-Parametern nachzuweisen und zudem Unterschiede in der Häufigkeit und Verteilung der SNPs zwischen Normalbevölkerung und Hochrisikokollektiv festzustellen.

So können SNPs identifiziert werden, die für eine QTc-Verlängerung und ventrikuläre Arrhythmien prädisponieren.

Die Suche wird anhand einer etablierten Methode mittels TaqMan®-Analyse durchgeführt, mit welcher eine PCR (*polymerase chain reaction*) mit nachfolgender allelischer Diskriminierung möglich ist.

2 Methoden

2.1 Überblick

In die systematische Suche nach möglichen Polymorphismen im Ankyrin B Gen wurden zwei verschiedene Populationen einbezogen: die MONICA-Augsburg-Population als repräsentative Stichprobe aus der Normalbevölkerung und ein Hochrisikokollektiv, das aus Patienten mit struktureller Herzerkrankung besteht. Die DNA beider Kollektive wurde mittels TaqMan[®]-Analyse genotypisiert. Dabei wurde zuerst eine PCR (polymerase chain reaction) der kodierenden Abschnitte des Gens durchgeführt und anschließend eine allelische Diskriminierung. In der MONICA-Augsburg-Population wurden insgesamt 17 „Single Nucleotide Polymorphisms“ untersucht. Die Ergebnisse wurden ausgewertet und genau auf mögliche Assoziationen zwischen Genotypen und Phänotypen hin getestet. Interessiert hat hier vor allem, ob signifikante Korrelationen zwischen Basenpaarungen an den jeweiligen Polymorphismen und den damit verbundenen Phänotypen bestehen, nämlich Repolarisationsdauer (QTc-Zeit), linksventrikulärer Funktion und Herzmorphologie. Die (sechs) signifikanten DNA-Polymorphismen wurden schließlich im Hochrisikokollektiv genotypisiert (ebenfalls mittels TaqMan[®]-Analyse).

Anschließend galt es, die Allelverteilungen in den sechs SNPs zwischen Normalbevölkerung und Hochrisikokollektiv zu vergleichen.

Abbildung 3 bietet eine anschauliche Darstellung des Gens und der 17 SNPs. Die Genompositionen der SNPs auf Chromosom 4 können anhand der in der Abbildung aufgeführten rs-Nummern im Anhang nachgeschlagen werden (S. 81 /Kapitel 6.3).

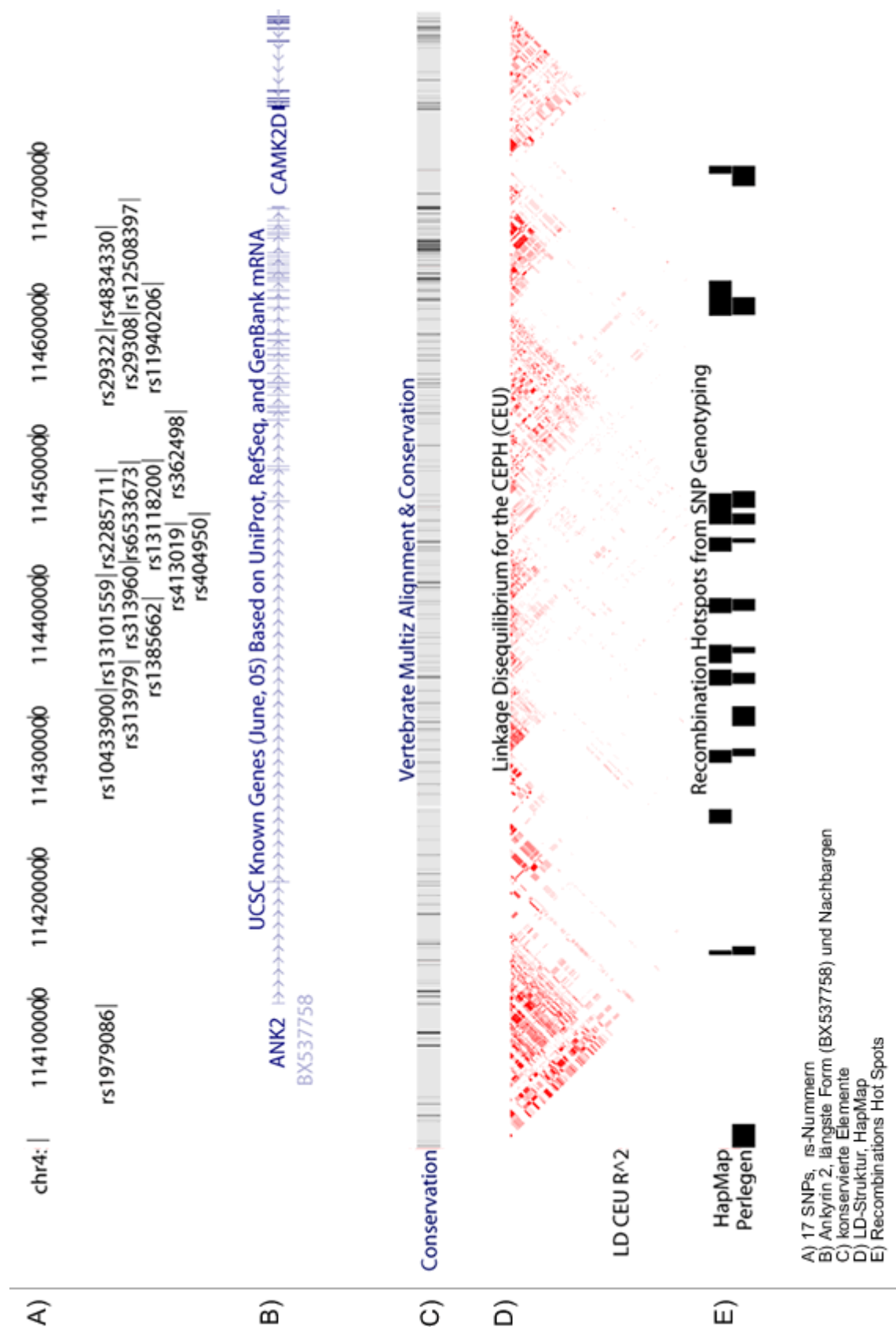


Abbildung 3: Schematische Darstellung der genomischen Region am Ankyrin 2 im UCSC genome browser²⁰
 Dargestellt ist der Abschnitt auf Chromosom 4 von Position 113.995.001-114.800.000
 (hg17: „human genome 17“)

2.2 Populationen

2.2.1 MONICA-Augsburg-Population

Wie bereits erwähnt wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Populationen molekulargenetisch untersucht: zum einen Probanden aus der MONICA-Augsburg-Population und zum anderen Probanden, die aufgrund einer strukturellen Herzkrankheit, wie einer dilatativen Cardiomyopathie (DCM) oder einer koronaren Herzerkrankung (KHK), im Weiteren als Hochrisikokollektiv bezeichnet werden. Aus der MONICA-Augsburg-Population wurden insgesamt 1492 Probanden molekulargenetisch untersucht.

Zu Beginn der Vorbereitungen wurde bei 1675 Personen ein digitalisiertes EKG aufgezeichnet und es wurden all diejenigen, bei denen das EKG einen Schenkelblock oder Repolarisationsstörungen aufdeckte, ausgeschlossen. Von den verbleibenden 1516 Personen wurden weitere Daten erhoben: Alle Teilnehmer wurden befragt hinsichtlich körperlicher Aktivitäten, persönlichen Gewohnheiten wie Nikotin und Alkohol, Medikamenten und früheren Krankheiten. Darüber hinaus wurden biometrische, anthropometrische und echokardiographische Daten erhoben, wobei die Dauer des QT-Intervalls anhand der digitalisierten EKG's berechnet wurde.

Die korrigierte QT-Zeit (QTc) wurde mit Hilfe der Bazett-Formel berechnet:

$$QTc = QT\text{-Intervall} / \sqrt{RR \text{ in sec}}$$

Nach einer 30-minütigen Ruhepause wurde den Probanden Blut entnommen (wobei die Probanden nicht nüchtern waren), das Blut wurde zentrifugiert und daraufhin das Plasma bei -80°C gelagert bis die DNA-Analyse durchgeführt wurde.²¹

Wichtig zu erwähnen bleibt, dass die Probanden, die alle aus der Gegend in und um Augsburg stammen, nicht miteinander verwandt sind.

Vor der Blutentnahme wurden sie über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert; ihr schriftliches Einverständnis dazu haben sie gegeben.

Die zuständige Ethikkommission der Universität Regensburg hat die Studie genehmigt.

	Gesamt	Männer	Frauen
Anzahl der Probanden	1483	759	724
Alter [Jahre]	51,16 ± 13,84 (N = 1469)	51,44 ± 14,03 (N = 751)	50,86 ± 13,63 (N = 718)
RR systolisch [mmHg]	134,45 ± 19,92 (N = 1449)	137,22 ± 18,73 (N = 741)	131,55 ± 20,71 (N = 708)
RR diastolisch [mmHg]	80,62 ± 11,66 (N = 1449)	82,56 ± 11,71 (N = 741)	78,59 ± 11,27 (N = 708)
Herzfrequenz [Schläge/min]	69,89 ± 12,43 (N = 1462)	69,05 ± 12,33 (N = 748)	70,76 ± 12,49 (N = 714)
BMI [kg/m ²]	26,75 ± 4,16 (N = 1161)	27,03 ± 3,56 (N = 587)	26,46 ± 4,68 (N = 574)
QTc-Zeit [ms]	397,06 ± 21,59 (N = 1223)	393,20 ± 22,24 (N = 631)	401,17 ± 20,1 (N = 592)
QT-Dispersion [ms]	72,33 ± 35,84 (N = 1223)	73,64 ± 36,54 (N = 631)	70,94 ± 35,05 (N = 592)
Sokolov-Index [mV]	2,2157 ± 0,8305 (N = 1223)	2,3856 ± 0,8705 (N = 631)	2,0347 ± 0,7448 (N = 592)
LVESD	30,95 ± 4,39 (N = 1234)	32,62 ± 4,34 (N = 605)	29,33 ± 3,81 (N = 629)
LVEDD	48,02 ± 4,83 (N = 1236)	50,22 ± 4,50 (N = 607)	45,89 ± 4,14 (N = 629)
Ejektionsfraktion	0,56 ± 0,09 (N = 750)	0,55 ± 0,09 (N = 348)	203,47 ± 74,48 (N = 402)

Tabelle 2: Parameter der MONICA-Augsburg-Population
Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung, N: Anzahl

Erläuterung zu Tabelle 2:

Blutdruck (RR): normaler Blutdruck bis 140/90mmHg; 140/90mmHg bis 159/95mmHg: kontrollbedürftiger Grenzbereich; 160/95mmHg: Blutdruck eindeutig erhöht (bei einmaligem Messen); Hypertonie: Werte über 140/90mmHg bei wiederholten Messungen²²

Herzfrequenz: Zahl der Herzschläge pro Minute, abhängig u.a. von Lebensalter, Geschlecht, sportlichem Trainingszustand, Körpertemperatur, Vigilanz und vegetativen Faktoren; Bradykardie: Pulsfrequenz unter 60/min; Tachykardie: Pulsfrequenz über 130/min²³

BMI (Body Mass Index): BMI = Körpergewicht [kg] / Körperlänge [m]²

normaler BMI: bei Männern 20-25, bei Frauen 19-24²²

QT-Dauer: Beginn Q-Zacke bis Ende T-Welle²⁴; Normwerte: frequenzabhängig, bei 70/min 0,32 – 0,39s²⁵

QTc-Zeit: relative QT-Dauer (korrigierte QT-Dauer) unter Beachtung der Herzfrequenz; als obere Grenze gilt bei Männern QTc > 450ms und bei Frauen QTc > 480ms²⁴

QT-Dispersion: die Differenz zwischen dem längsten und dem kürzesten QT-Intervall im Oberflächen-EKG; spiegelt das Ausmaß der Inhomogenität der Ventrikelrepolarisation wider²⁴

QT-Dispersion = QTmax-QTmin:

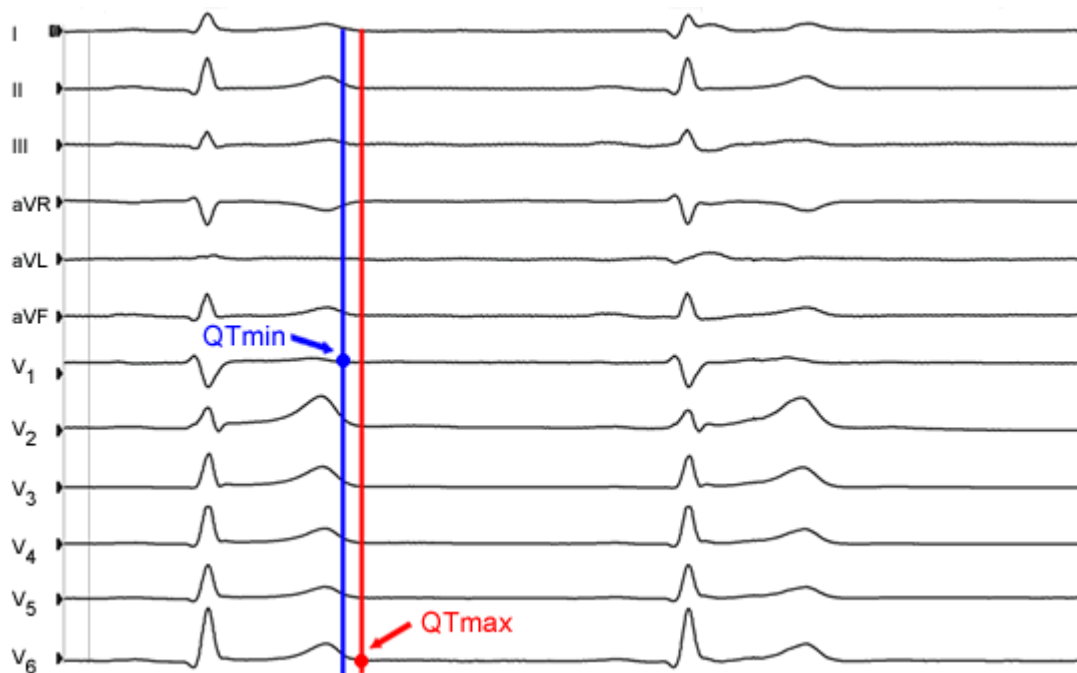


Abbildung 4: Oberflächen-EKG zur Erläuterung der QT-Dispersion

Sokolov-Index: EKG-Kriterium für Herzhypertrophie; bei Linkshypertrophie ist die Summe aus R-Zacke in V_5 oder V_6 und S-Zacke in V_1 oder V_2 größer als 3,5 mV; bei Rechtshypertrophie ist die Summe aus R-Zacke in V_1 oder V_2 und S-Zacke in V_5 oder V_6 größer als 1,05 mV²³

LVESD: linksventrikulärer endsystolischer Diameter

LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Diameter

Ejektionsfraktion: diejenige Blutmenge, die die linke Herzkammer in der Systole auswirft²³

2.2.2 Hochrisikokollektiv

Um mögliche Unterschiede in der Häufigkeit und Verteilung der SNPs zwischen Normalbevölkerung (bestehend aus der MONICA-Augsburg-Population) und Menschen mit struktureller Herzerkrankung aufzudecken und mögliche Assoziationen zu EKG-Parametern zu untersuchen, wurde die DNA eines Hochrisikokollektivs genotypisiert (insgesamt 320 Probanden). Dieses Kollektiv bestand aus Probanden mit koronarer Herzerkrankung oder dilatativer Kardiomyopathie, denen allen in der Vorgeschichte ein Defibrillator implantiert worden war. Als Kontrollgruppe dienten Probanden mit koronarer Herzerkrankung ohne Defibrillator. Diese Gruppe umfasste 301 Probanden.

Probanden aus dem Hochrisikokollektiv werden im Folgenden als *cases* bezeichnet und Probanden aus der Kontrollgruppe als *controls*.

Eine Übersicht über das untersuchte Kollektiv liefert folgende Tabelle:

	Cases	Controls
Anzahl gesamt	225	301
Anzahl Männer	187	256
Anzahl Frauen	38	45
Probanden mit KHK	159	301
Probanden mit DCM	66	--
Alter	30 J. bis 84 J.	35 J. bis 82 J.
Ejektionsfraktion (Kategorie)	1 - 4	1 – 3

Tabelle 3: Parameter der Hochrisikopopulation

Bei den Probanden aus dem Hochrisikokollektiv war es nicht möglich, von allen sämtliche Daten zu erheben. Deshalb wurden die Personen mit fehlenden Daten in der oben abgebildeten Tabelle in der jeweiligen Kategorie nicht berücksichtigt (unter cases sind aus diesem Grund nur 225 Probanden aufgeführt, obwohl 320 Probanden genotypisiert wurden).

Ejektionsfraktion:	1	2	3	4
Cases – KHK	30,9%	51,3%	17,8%	--
Cases – DCM	21,3%	23%	29,5%	26,2%
Controls – nur KHK	33,1%	53,5%	13,4%	--

Tabelle 4: Ejektionsfraktion

Kategorie 1-4 je nach Pumpfunktion: 1 = leichtgradig eingeschränkt, 2 = mittelgradig eingeschränkt, 3 = höhergradig eingeschränkt, 4 = hochgradig eingeschränkt

In der Gruppe der cases hatten die Probanden mit dilatativer Cardiomyopathie durchschnittlich eine schlechtere kardiale Pumpfunktion als die Probanden mit koronarer Herzkrankheit aus der gleichen Gruppe und aus der Kontrollgruppe.

Altersverteilung:

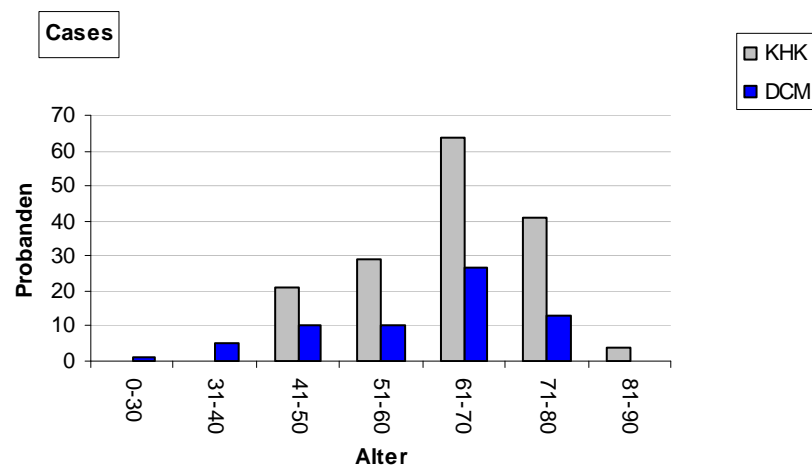


Abbildung 5: Altersverteilung in der Gruppe der cases

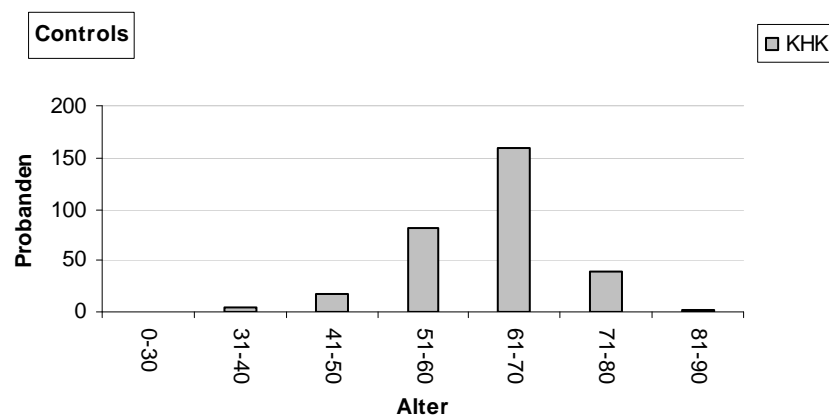


Abbildung 6: Altersverteilung in der Gruppe der controls

Geschlechterverteilung:

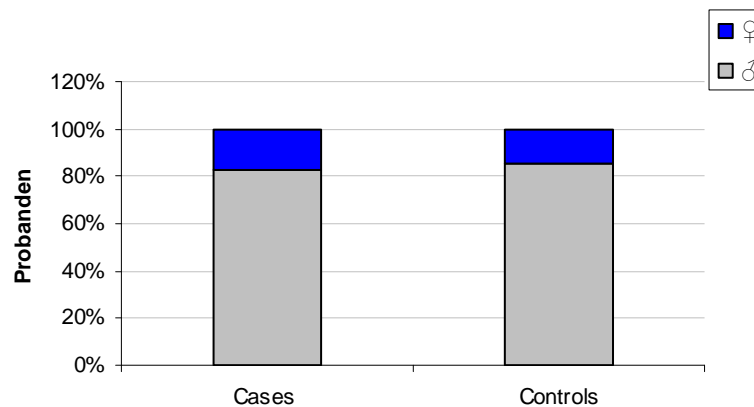


Abbildung 7: Geschlechterverteilung in den *cases* und *controls*

2.2.3 Erstellung der Datenbank für das Hochrisikokollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Populationen untersucht: die MONICA-Augsburg-Population und ein Hochrisikokollektiv. Aus der MONICA-Augsburg-Population waren biometrische, anthropometrische und echokardiographische Daten bei Durchführung dieser Arbeit bereits vorhanden. Anders verhielt es sich mit den Daten aus dem Hochrisikokollektiv: Diese wurden von der Verfasserin dieser Arbeit in Form einer Tabelle im Programm „Microsoft Access“ zusammengetragen.

Dabei wurde im klinikinternen Netzwerk „SAP“ entweder anhand des Geburtsdatums und des Vor- und Nachnamens der untersuchten Probanden gesucht oder –sofern gegeben– anhand der SAP-Nummer (falls nicht gegeben, wurde die SAP-Nummer nachgetragen).

Systematisch wurde in früheren Arztbriefen, Echokardiographiebefunden und EKGs nach den geforderten Daten gesucht. Anschließend wurden diese in die Tabelle eingetragen.

Die Tabelle gliedert sich in mehrere Kategorien: Anamnese, Defidaten, EKG-Daten, Daten aus dem Herzecho, Daten aus dem Herzkatheter, Risikofaktoren und Stammdaten.

Unter der Kategorie „**Anamnese**“ wurde nach folgenden Parametern bzw. Fragestellungen gesucht (für „ja“ wurde eine 1, für „nein“ eine 0 in die Tabelle eingetragen):

Hatte der Patient / die Patientin in der Vorgeschichte einen *Infarkt*? Wann war das *Infarktdatum*? (Angabe der Jahreszahl) Wo war der Infarkt lokalisiert (Vorderwand, Hinterwand oder Seitenwand)? Hatte der Patient/die Patientin einen *ACVB* (*Aorto Coronarer*

Venen Bypass)? Kam es in der Vorgeschichte zu einer *Synkope*? Bestehen *Belastungsdyspnoe* oder *Ruhedyspnoe*? Leidet der Patient / die Patientin unter *Angina pectoris*? Gab es in der Vorgeschichte einen *Schlaganfall* oder *thromboembolische* Ereignisse? Wie ist die Belastbarkeit nach der *NYHA-Klassifikation* (NYHA I: uneingeschränkt belastbar, keine Symptome, NYHA II: Dyspnoe und vorzeitige Erschöpfung bei normaler Belastung, NYHA III: Dyspnoe und vorzeitige Erschöpfung bei leichter Belastung, NYHA IV: Symptome der Herzinsuffizienz in Ruhe, Verschlechterung bei geringster Belastung³²)? Liegt eine *COPD* vor? Bestehen *Lebererkrankungen* oder *Nierenerkrankungen*? Wie ist die *Alkoholanamnese*? Ist der Patient/die Patientin an einer *muskulären Dystrophie* erkrankt?

Bezüglich des **Defibrillators** war insbesondere von Interesse, um welches *Kammersystem* es sich handelte (1 = 1-Kammersystem, 2 = 2-Kammersystem, 3 = 3-Kammersystem), außerdem war der *Hersteller* wichtig (Freitext Herstellername) und der *Typ* (Freitext Typenbezeichnung). Es wurde auch erhoben, wann die *Erstimplantation* (Datum) war, ob es zu einem *Defi-Wechsel* gekommen war (ja = 1, nein = 0), ggf. die *Anzahl der Wechsel* (Zahlenfeld 1 bis X), und schließlich der *ICD count*, d.h. Anzahl der ICD-Therapieabgaben wie Überstimulation oder Schock. Hier wurden nur adäquate Therapien bei Kammertachykardien erfasst.

In früheren Aufzeichnungen von **Oberflächen-EKGs** wurde nach der *QRS-Dauer* gesucht (Angabe in ms), nach der *QT-Zeit* (Angabe in ms), der *QTc-Zeit* (nach Bazett-Formel) und dem *PR-Intervall* (Angabe in ms). In die Tabelle wurde überdies eingetragen, ob ein *Linksschenkelblock* oder ein *Rechtsschenkelblock* bestand (ja = 1, nein = 0), ob ein *AV-Block* vorlag (0 = kein AV-Block, 1 = AV-Block I°, 2 = AV-Block II°, 3 = AV-Block III°), wie der *Rhythmus* war (1 = Sinusrhythmus, 2 = Vorhofflimmern) und ob ein *Herzschrittmacher* implantiert worden war (ja = 1, nein = 0).

Aus den **Echokardiographie**befunden wurde die *Ejektionsfraktion* erfasst (0 = normale LV-Funktion, 1 = leichtgradig eingeschränkte LV-Funktion, 2 = mittelgradig eingeschränkte LV-Funktion, 3 = höhergradig eingeschränkte LV-Funktion, 4 = hochgradig eingeschränkte LV-Funktion) und - bestimmt in der parasternalen Längsachse- „*fractional shortening*“, *LVEDD* (linksventrikulärer enddiastolischer Diameter), *LVESD* (linksventrikulärer endsystolischer Diameter), *LA* („left atrium“), *Dicke der Hinterwand*, *Dicke des Septums* und *maximale Wanddicke*.

Interessant war außerdem, ob *Klappenvitien* bestehen: ja = 1, nein = 0; unter „ja“ wurden alle Vitien ab dem Grad I gerechnet

Aus den **Herzkatheter**daten wurden neben dem *linksventrikulären endsystolischen Volumen* (LVESV; Angabe in ml), dem *linksventrikulären enddiastolischen Volumen* (LVEDV; Angabe in ml), dem *Schlagvolumen* (SV; Angabe in ml) und der *Ejektionsfraktion* (EF; Angabe in %) Parameter wie *Signifikante KHK größer 50* (*Signifik_KHK_gr50*), *Anzahl_Gefäße*, *Lumeneinengung* durch Plaques kleiner 50% (*Plaques_Lumeneineng_kl50*), *Ausschluss_KHK*, und *Herzzeitvolumen* (HZV) tabellarisch festgehalten.

Außer der *Größe* (Angabe in m) und dem *Gewicht* (Angabe in kg) wurden folgende **Risikofaktoren** erhoben, die mit 1 (= ja) oder 0 (= nein) beantwortet wurden: *Hypertonus*, *Diabetes*, *Rauchen*, *Hyperlipidämie* und *begleitende KHK*.

Folgende **Stammdaten** waren wichtig: *SAP-Nummer*, *Name*, *Vorname*, *Geburtsdatum* und *Geschlecht*, zudem die *Indikation* für eine Defi-Implantation (0 = idiopathisch, 1 = KHK, 2 = DCM, 3 = Rechtsventrikuläre Dysplasie, 4 = Myokarditis, 5 = HCM, 6 = Fibrose, 7 = LQT-Syndrom, 8=Herz-OP, 9 = SCD, d.h. „sudden cardiac death“ – überlebter plötzlicher Herztod), ob *Blut* im Labor vorhanden ist (ja=1, nein=0) und das *Sterbedatum*.

Aus dieser Datenbank wurden die Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und die Patienten mit dilatativer Cardiomyopathie (DCM) für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Genotypisierung ausgewählt.

Die erstellte Datenbank wird in Zukunft für weitere Studien genutzt.

2.3 Isolierung und Aufarbeitung humaner DNS

Als Antikoagulans wurde dem Blut EDTA zugegeben und die hochmolekulare, menschliche DNS aus den kernhaltigen Leukozyten von eingefrorenem und frischem Blut isoliert (Pure Gene DNA Kit, Gentra, USA). Durch spektrometrische Messung bei 260 und 280 nm wurde die Konzentration und Reinheit der DNS bestimmt.

2.4 Suche nach Polymorphismen im Ankyrin B Gen

2.4.1 Pipettieransatz

Für die Suche nach Polymorphismen wurden Platten („Corning PCR 384-well plate“) mit jeweils 384 Wells (Vertiefungen) verwendet. Jedes Well enthielt die DNA eines bestimmten Probanden. Da die MONICA-Augsburg-Population aus 1492 Probanden bestand und auf jede Platte 384 DNA-Proben passen, waren für die Genotypisierung dieser Population vier Platten nötig.

Jede Platte enthielt auch eine bestimmte Anzahl an Leerwerten (NTC's – „no-template control“).

Zuerst wurde nur ein Teil der MONICA-Augsburg-Population auf einer 384er-Platte mit insgesamt 26 Assays genotypisiert und anschließend eine LD-Bestimmung (LD = Linkage Disequilibrium) durchgeführt. Da sich in der LD-Bestimmung gezeigt hat, dass einige SNPs gekoppelt miteinander vererbt werden, konnten für die weitere Genotypisierung der restlichen drei Platten fünf Assays weggelassen werden, so dass mit 17 Assays weitergearbeitet wurde. Dies bedeutet, dass der restliche Teil der MONICA-Augsburg-Population mit 17 Assays genotypisiert wurde.

Für die Genotypisierung wurde ein Ansatz aus Master Mix[®], Wasser und Assay in ein Röhrchen pipettiert, wobei der Assay vor dem Pipettieren kurz auf dem Reagenzglasschüttler gevortext und danach in der Mikrozentrifuge zentrifugiert wurde.

Theoretisch sind für eine Reaktion (d.h. für ein Well auf der 384er Platte) folgende Volumina nötig: 2,5µL Master Mix, 2,25µL Wasser und 0,25µL Assay.

Da jedoch der Pipettierroboter, mit dessen Hilfe der Ansatz auf die 384er Platte/n verteilt wurde, ein wenig mehr Volumen benötigte, wurde bei einer 384er Platte ein Ansatz für theoretisch 420 Proben vorpipettiert.

Für die Genotypisierung der ersten Platte wurden folgende Volumina verwendet:

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1. Master Mix [®] | 1.050 µL (pipettiert: 2x 525 µL) |
| 2. Wasser | 945 µL |
| 3. Assay | 105 µL |

Da für die PCR neben dem TaqMan[®] zwei externe Cycler zur Verfügung standen, konnten immer gleich drei Ansätze für drei Platten pipettiert werden (jede Platte mit einem anderen Assay). Diese wurden gleichzeitig in den Geräten gestartet.

Auch für die Genotypisierung der drei weiteren Platten, die DNA von Probanden aus der Normalbevölkerung enthielten, wurde ein Ansatz pipettiert, der theoretisch für 420 Proben

reichen würde. Nun war dagegen **ein** Ansatz für **drei** 384er-Platten bestimmt und es ergab sich folgendes Schema:

1. Master Mix®	3.150 µL (pipettiert: 4x 787,5 µL)
2. Wasser	2.835 µL (pipettiert: 3x 945 µL)
3. Assay	315 µL (pipettiert: 1x 165 µL + 1x 150 µL)

Nach der statistischen Auswertung der Daten aus der Normalbevölkerung wurde anschließend mit denjenigen sechs Assays, die bei der Auswertung signifikante Ergebnisse lieferten, das Hochrisikokollektiv genotypisiert. Dieses zweite untersuchte Kollektiv bestand aus 320 Probanden, so dass eine einzige 384er-Platte notwendig war. Als Vergleichsgruppe wurde eine Kontrollplatte (DNA von KHK-Patienten; S.19/Kapitel 2.2.2) genotypisiert. Diese beiden Platten wurden jeweils gleichzeitig mit demselben Assay genotypisiert. Um Assay zu sparen, wurde der Ansatz für theoretisch 405 Proben angesetzt und die Volumina an Master Mix® und Wasser dementsprechend angeglichen:

1. Master Mix®	2.025 µL (pipettiert: 2x 1.000 µL + 1x 25 µL)
2. Wasser	105 µL
3. Assay	1.920 µL (pipettiert: 1x1.000 µL + 1x920 µL)

Jedes Röhrchen mit einem Ansatz bestehend aus Master Mix®, Wasser und Assay wurde durch mehrmaliges Ansaugen mit der 1000µL Pipette grob gemischt, dann auf dem Reagenzglasschüttler nochmals gut gemischt und durch langsames Ausdrehen des Schüttlers herunterzentrifugiert. Dann wurde der aus Wasser, Master Mix® und Assay bestehende Ansatz mit der Pipette auf acht Eppendorf-Cups verteilt. Aus Erfahrung hat sich gezeigt, dass es geschickter ist, in jedes der acht Cups etwas weniger als $\frac{1}{8}$ des Gesamtvolumens zu pipettieren (im 8. Cup war sonst immer zu wenig Volumen für den Pipettierroboter). Also wurden pro Cup 4µL weniger genommen und der Rest mit der Pipette tropfenweise auf die acht Cups aufgeteilt.

Danach wurde jedes Cup auf dem Reagenzglasschüttler gevortext und in der Mikrozentrifuge das Gemisch zentrifugiert. Anschließend wurden die acht Cups in die für den Pipettierroboter Tecan® bestimmte Halterung gesteckt und die 384er Platte/n in die vorgesehenen Positionen gelegt. Der Roboter verteilte den in den acht Cups befindlichen Ansatz in die Wells auf die 384er Platten (5µL pro Well). Nachdem die Platte/die Platten

fertig pipettiert war/en, wurde nochmals nachkontrolliert, ob kein Well ausgelassen wurde. Falls doch oder falls in einem Well eindeutig zu wenig war, wurden mit der 10 µL Pipette pro leerem oder zu wenig gefülltem Well 5µL händisch nachpipettiert.

Nun galt es jede Platte mit einer durchsichtigen Folie („Optically Clear Adhesive Seal Sheet“) zu versehen und die Platte/n in der Megafuge 1.0 für 5 Minuten bei einer Umdrehung von 2.200 U/min zu zentrifugieren. Durch Sichtkontrolle wurde nach dem Zentrifugieren überprüft, ob sich in einem oder mehreren Wells Luftblasen gebildet hatten, denn diese stören eventuell die PCR bzw. die Allelische Diskriminierung. Durch mehrmaliges Klopfen der Platte auf sauberem Untergrund konnten größere Luftblasen beseitigt werden (kleinere Blasen waren unerheblich). Danach wurde ggf. nochmals kurz zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde die Platte entweder im TaqMan® oder in einem externen Cycler gestartet, wo eine PCR durchgeführt wurde (Dauer der PCR: im TaqMan® 1,5h, im Hybaid Thermocycler 2h, im Gene Amp® Cycler 1h 45 min).

Da pro Durchgang immer drei Platten gleichzeitig vorpipettiert wurden und für die Genotypisierung der Normalbevölkerung zwei externe Cycler zur Verfügung standen, wurde jeweils eine 384er-Platte im TaqMan® gestartet und die zwei restlichen Platten in den externen Cyclern.

Für die Genotypisierung des Hochrisikokollektivs und der KHK-Kontrollgruppe standen zusätzlich zwei weitere Cycler zur Verfügung, in denen jeweils zwei weitere Platten gleichzeitig gestartet werden konnten, so dass insgesamt bei sieben 384er Platten parallel eine PCR gemacht wurde. Diese wird im folgenden Abschnitt genauer erläutert.

2.4.2 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Das Verfahren der PCR wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und stellt einen Durchbruch für die Gentechnik dar.²⁶

Da die PCR im Bereich der Sequenzanalyse, bei Genexpressionsstudien und bei der Genklonierung eingesetzt wird, ist sie zu einem wichtigen Werkzeug der modernen Molekularbiologie geworden. Das Prinzip der PCR-Reaktion basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Startersequenzen, den sog. Primern, liegt. Die Basenabfolge der Primer muss komplementär zur amplifizierenden DNA-Sequenz sein. Die Primer sollten außerdem eine Länge von 18 bis 30 Basen haben, einen G/C-Gehalt zwischen 20-80%, sowie eine Schmelztemperatur von ca. 60°C. Binden die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte, so katalysiert das Enzym DNA-Polymerase die in-vitro-DNA-Synthese.²⁷

Das Prinzip der PCR ist in folgender Abbildung dargestellt:

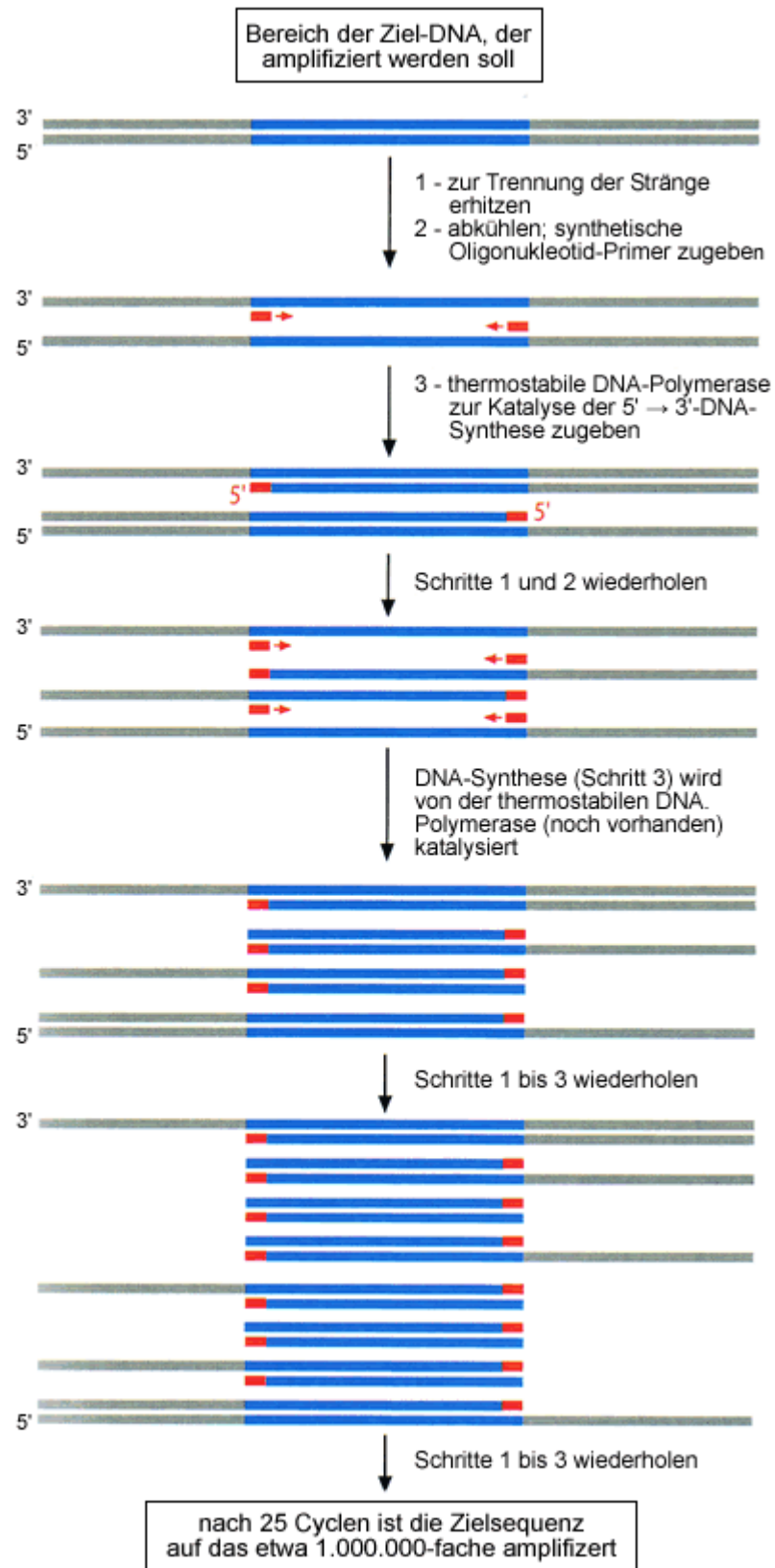


Abbildung 8: polymerase chain reaction (PCR)²⁶

Erläuterung:

1. Der Doppelstrang wird durch Erhöhen der Temperatur auf 90°C denaturiert.
 2. Nachdem auf etwa 50°C abgekühlt wurde, werden zwei Oligonukleotide zugesetzt, die aus 15-25 Basen bestehen und der Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind. Meist muss hierbei die Temperatur auf 60-70°C erhöht werden, um unspezifische Hybridisierungen zu vermeiden.
 3. Nun werden die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert, indem eine DNA-Polymerase zugesetzt wird, d.h. es entstehen zwei neue Doppelstränge.
- Derartige Reaktionszyklen können mehrfach wiederholt werden und ergeben eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA.

Für die PCR benötigt der TaqMan® genau 90 Minuten. Nach Beenden des Vorgangs wird die erfolgreiche PCR wie unten abgebildet dargestellt:

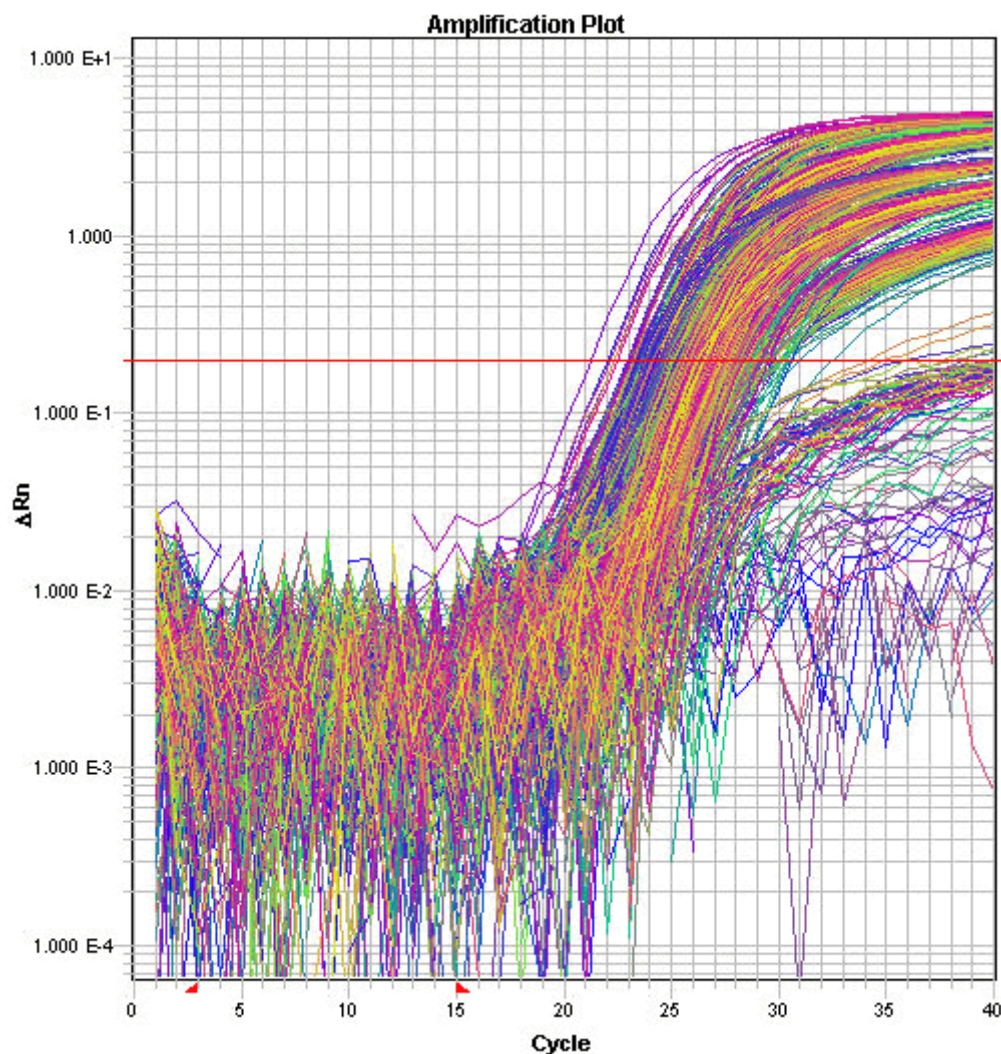


Abbildung 9: Darstellung der PCR mit dem Programm SDS 2.2

Erläuterung: jede Farbe kennzeichnet eines der 384 Wells; der deutliche Ausschlag nach oben über die rote Linie hinweg ist ein Zeichen dafür, dass die PCR funktioniert hat

2.4.3 Allelische Diskriminierung

Grundlagen

Verwendet wurde ein TaqMan[®] SNP Genotyping Assay, der zwei lokusspezifische PCR Primer beinhaltet, die den interessierenden SNP flankieren, und zwei Allel-spezifische Oligonukleotid TaqMan[®] Proben. Diese Proben besitzen einen *reporter*-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und außerdem einen nicht-fluoreszierenden *quencher* (NFQ) mit einem MGB (*minor groove binder*) am 3' Ende. Die Fluoreszenzemission des *reporters* wird bei der intakten TaqMan[®]-Sonde durch die Nähe zum *quencher* unterdrückt.²⁷

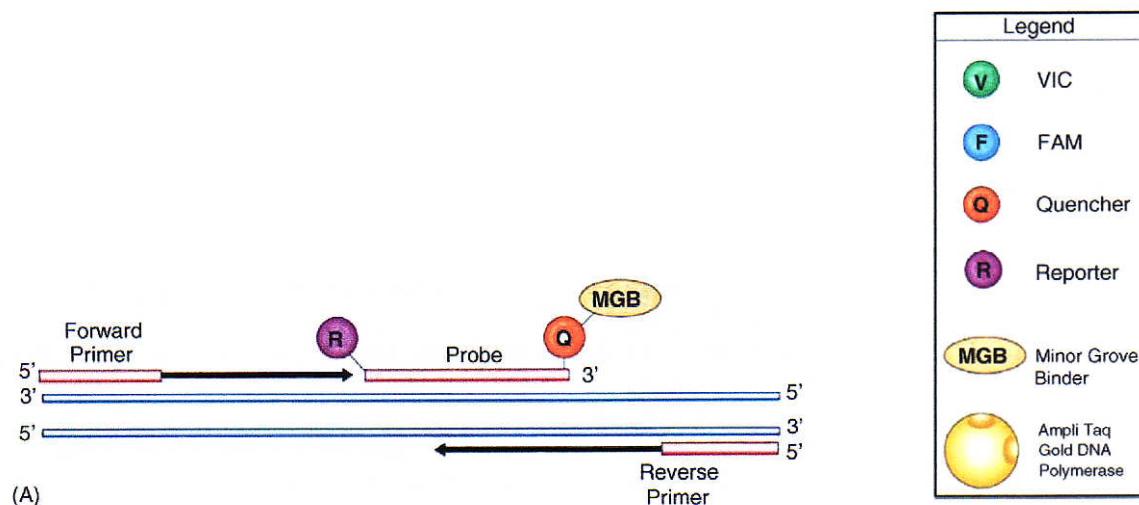


Abbildung 10: DNA-Strang, Primer, Oligonukleotid TaqMan Probe mit Reporter, Quencher und MGB²⁸

Durch die enge physikalische Nähe entsteht der *fluorescent resonance energy transfer* (FRET) Effekt, der die vom 5' *fluorophore* ausgesendete Energie löschen soll.

Die zum Zielallel komplementäre Probe wird in jedem PCR Reaktionszyklus von der 5' Exonuklease Aktivität der AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase gespalten, so dass ein Fluoreszenzsignal erzeugt wird. Bei der Neustrangsynthese schneidet also die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität die TaqMan[®]-Probe in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom *quencher* kommt und die Fluoreszenz

des *reporters* freigesetzt werden kann. Erst durch Abspaltung des *reporters* (R) vom *quencher* (Q) durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Fluoreszenz des *reporters* messbar und zeigt die Synthese des spezifischen Zielstranges an.²⁷

Die PCR Primer amplifizieren einen spezifischen Locus auf der genomischen DNA (*template*), wobei jede fluoreszierende Farbstoff-gekoppelte Hybridisierungssonde widerspiegelt, ob sein assoziiertes Allel in der DNA-Probe vorkommt.

Bei jedem Zyklus der PCR wird durch die Spaltung einer oder beider allelspezifischer Proben ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das exponentiell zunimmt.

Die Zunahme der Fluoreszenz des *reporters* wird nach jedem Zyklus gemessen und ist wiederum proportional der Menge des DNA-Templates im Tube. Die Taq-Polymerase fragmentiert nur an die Zielsequenz gebundene TaqMan[®]-Sonden, nicht hybridisierte Einzelstränge bleiben unbeschadet. Dabei wird der 5' *fluorophore* vom 3' *quencher* freigesetzt. Wenn man zwei Proben verwendet, von denen eine spezifisch ist zu jedem Allel des betreffenden SNP und behaftet mit zwei *fluorophores*, können beide Allele in einem Singletube detektiert werden.²⁷

Der MGB erhöht die Proben T_M (Schmelztemperatur) und stabilisiert die DNA, erhöht jedoch nicht die Probenlänge.²⁹ Dadurch wird es möglich, kürzere Proben zu designen.²⁷

Die kürzeren Proben sind wiederum sensitiver für den Mismatch von Einzelbasen.

MGB-Proben eignen sich deshalb für allelische Diskriminierung und die Erkennung von SNPs.²⁹

Die Proben erhöhen auch die „signal-to-noise-ratio“ eines Assays, denn der reduzierte Abstand zwischen dem 5' *fluorophore* und dem 3' *quencher* verspricht ein effizienteres „quenching“ einer intakten Probe.

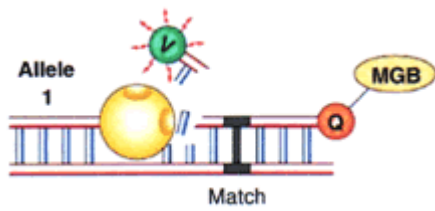


Abbildung 11: Abspaltung des reporters VIC (match)²⁸

Nach Binden des Primers amplifiziert die Taq-Polymerase den zum Zielstrang komplementären Neustrang. Ist die allelspezifische Oligonukleotid-TaqMan-Probe komplementär zum Zielstrang, so bindet sie an diesen. Durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der Reporter (in diesem Fall „Vic“) abgespalten und die Fluoreszenz des reporters wird messbar.

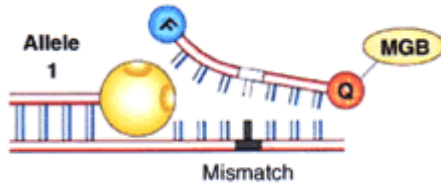


Abbildung 12: mismatch²⁸

Hier ist die Oligonukleotid-TaqMan-Probe nicht komplementär zum Zielstrang und konnte nicht an diesen binden. Der reporter kann nicht freigesetzt werden und somit wird auch keine Fluoreszenz messbar.

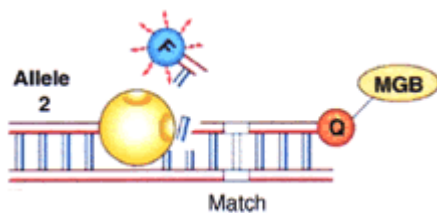


Abbildung 13: Abspaltung des reporters FAM (match)²⁸

Die allelspezifische Oligonukleotid-TaqMan-Probe ist komplementär zum Zielstrang und bindet an diesen. Durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der reporter (in diesem Fall „Fam“) abgespalten und die Fluoreszenz des reporters wird messbar.

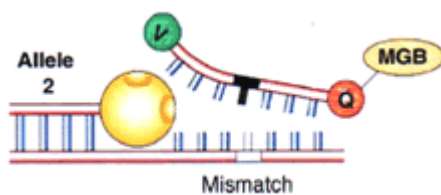


Abbildung 14: mismatch²⁸

Der reporter kann nicht freigesetzt werden und es wird keine Fluoreszenz messbar.

Mit der allelischen Diskriminierung im TaqMan® wurde begonnen, sobald die PCR der im TaqMan® gestarteten Platte beendet war. Sie wurde vom Gerät nach entsprechender manueller Einstellung automatisch durchgeführt und dauerte ca. 3 Minuten. Danach galt es, die NTC's (auf der Platte vorhandene Leerwerte) manuell einzustellen, den Auto Caller zu aktivieren und das Ergebnis auszuwerten (S. 35/Abb. 15).

Nach Beendigung der PCR in den externen Cyclern wurden die entsprechenden Platten in den TaqMan® gestellt und ebenso eine allelische Diskriminierung vorgenommen.

Ergebnisdarstellung

Die auf 384er-Platten befindlichen DNA-Proben wurden im TaqMan® gleichzeitig genotypisiert. Genotypisierungscalls werden für Einzelproben dadurch dargestellt, dass die genormte Intensität der *reporter* Farbstoffe in jedem Probenwell auf einem „cartesian plot“ (auch bekannt als „scatter“ oder „cluster plot“) eingezeichnet wird.

Ein „clustering algorithm“ in der Datenanalyse-Software weist einzelne Probanden einem speziellen Genotypencluster zu. Die Daten können auch auf einem polar plot angezeigt werden.

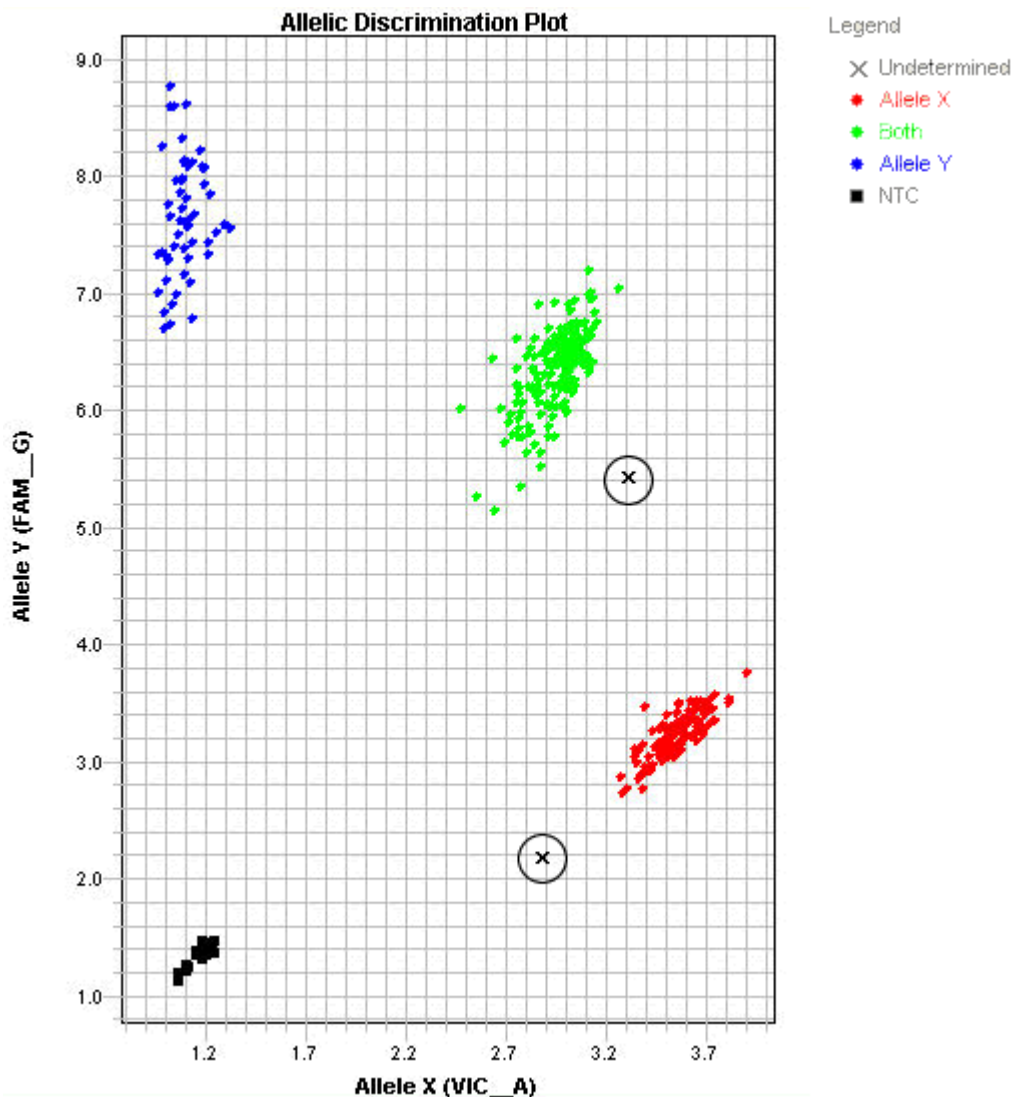


Abbildung 15: Darstellung der allelischen Diskriminierung im Programm SDS 2.2

Erläuterung: Jeder Punkt auf dem Amplification Plot kennzeichnet eines der 384 Wells.

blau: FAM, bei diesem Assay: GG; grün: BOTH, hier: AG; rot: VIC, hier: AA

NTCs (schwarze Kästchen) befinden sich am linken unteren Bildrand, schwarze Kreuze stellen „Undetermined“ (nicht bestimmte Signale) dar, d.h. in diesen Wells hat die allelische Diskriminierung nicht funktioniert. Hier findet man einen „Undetermined“ in der Nähe der BOTH-Wolke (hier markiert durch einen schwarzen Kreis) und einen „Undetermined“ in der Nähe der VIC-Wolke (ebenfalls markiert durch einen schwarzen Kreis).

Voneinander räumlich entfernte Punktwolken ohne Ausreißer (d.h. Farbpunkte, die weit von der Wolke entfernt liegen) stehen dafür, dass die allelische Diskriminierung gut funktioniert hat.

„Undetermined“ wurden manuell zugeordnet, solange die Kurve eindeutig einem VIC-, FAM- oder BOTH-Signal zugeordnet werden konnte. Hierzu drei Beispiele für eine VIC-, eine FAM- und eine BOTH-Kurve:

Beispiel für ein VIC-Signal:

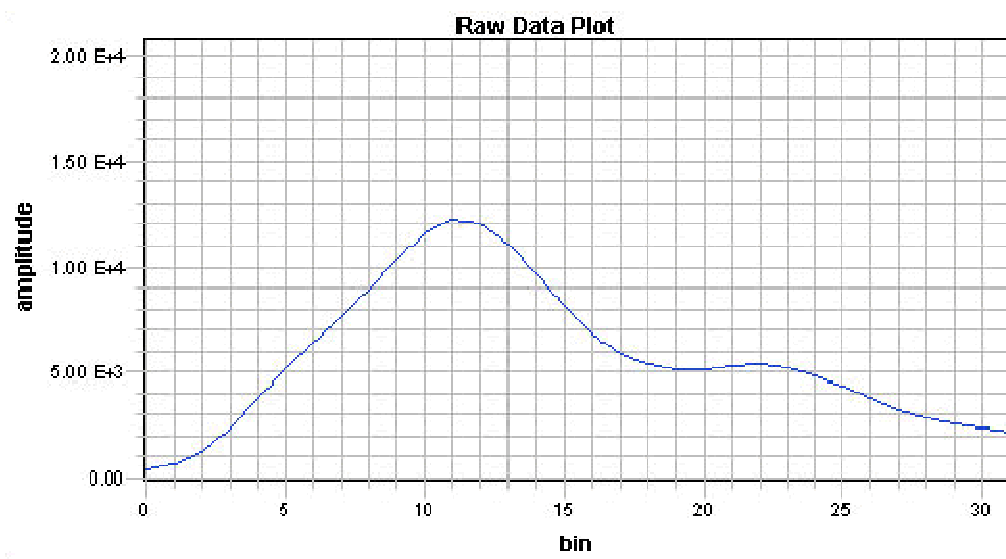


Abbildung 16: VIC-Signal

Beispiel für ein BOTH-Signal:

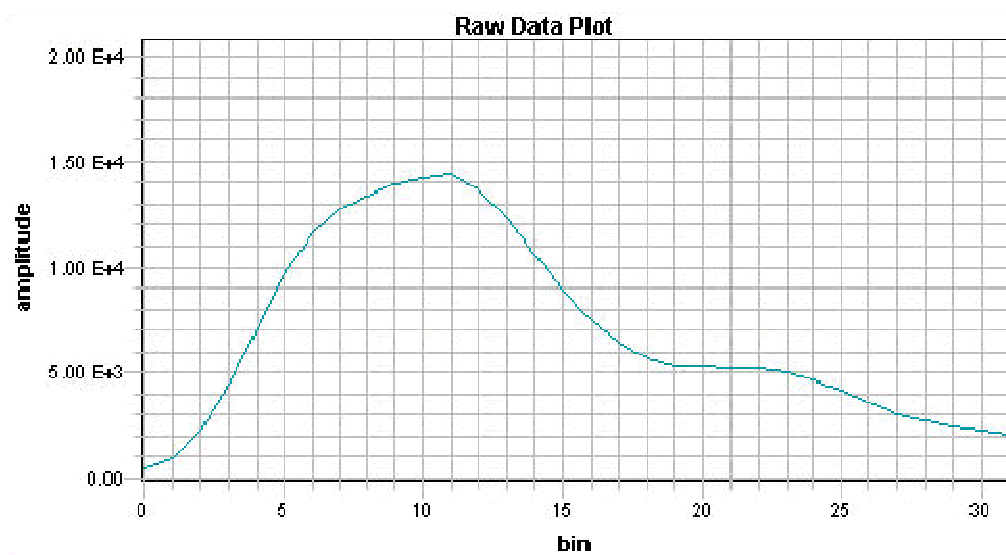


Abbildung 17: BOTH-Signal

Beispiel für ein FAM-Signal:

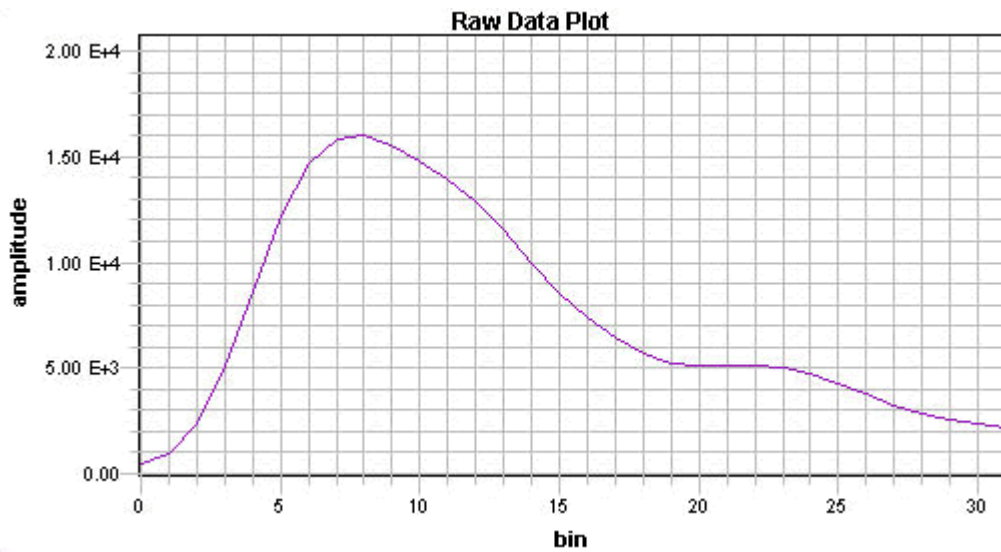


Abbildung 18: FAM-Signal

Die beiden „Undetermined“ (S.35/Abb. 15) zeigten hier Kurven, die eindeutig für BOTH bzw. VIC sprachen. Darüberhinaus konnte anhand der PCR-Zyklen eine genauere Aussage über den zeitlichen Abstand getroffen werden, mit dem die Signale ausgesandt wurden. Ist z.B. der zeitliche Abstand zwischen zwei VIC-Signalen klein, so spricht dies dafür, dass das VIC-Signal eindeutig ist und z.B. AA vorliegt. Ähnlich verhält es sich bei der Aussendung für BOTH: Werden das VIC- und das FAM-Signal in engem zeitlichem Abstand ausgesendet, so liegt eindeutig BOTH vor bzw. in diesem Fall (Assay ANK2_2198) die Kombination AG.

Somit war es in dem vorliegenden Fall möglich die „Undetermined“ manuell zuzuordnen (S.38/Abb. 19).

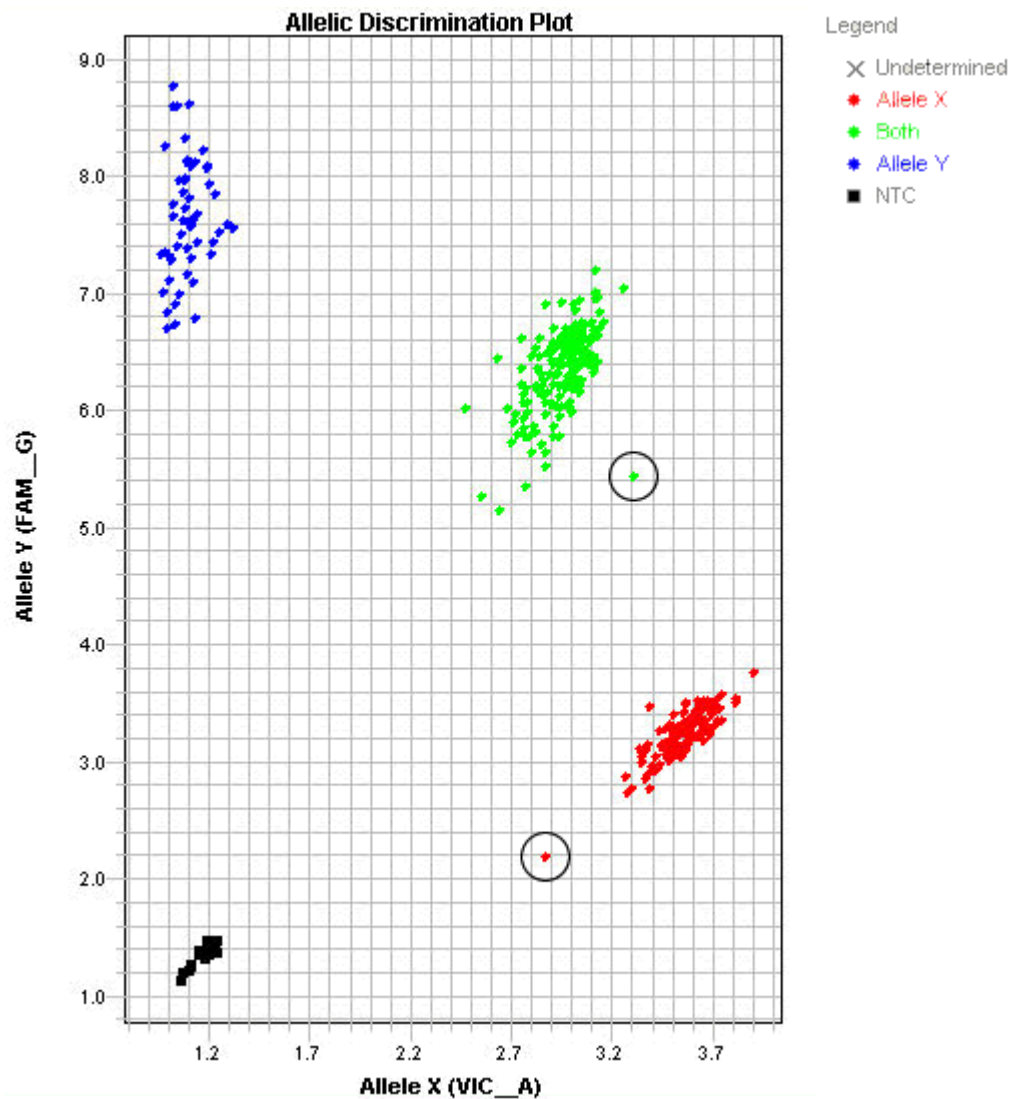


Abbildung 19: manuelles Zuordnen der beiden „Undetermined“ zu BOTH und VIC

Vorteile von TaqMan Assays

TaqMan SNP Genotyping Assays weisen signifikante technische Vorteile auf:

1. Sie benötigen nur einen einzigen enzymatischen Schritt.
2. Alle Assays benutzen universelle Reaktionen und thermische Zyklusbedingungen.
3. Die Stelle der Primer (und in einem geringeren Maß auch die der Proben) ist flexibel, was die Region betrifft, die den SNP umgibt.
4. Sie sind „closed-tube“ Assays, d.h. sie benötigen keine Bearbeitung nach der PCR.
5. Sie können Insertionen bzw. Deletionspolymorphismen genotypisieren.

6. Sie erlauben sehr einfache Arbeitsschritte, die darin bestehen, Universal Master Mix und den Assay zur Probe hinzuzufügen, gefolgt von der PCR und dem Ablesen zum Schluss („endpoint read“).²⁸

Zusätzlich können diese vergleichsweise einfachen Arbeitsschritte durch den Einsatz eines Roboters leicht automatisiert werden. Darüberhinaus gibt es eine Vielzahl an TaqMan® SNP Genotyping Assays.

2.5 Statistische Grundlagen

Die Daten aus den beiden Populationen wurden mit einer geeigneten Software statistisch ausgewertet. Dafür wurden unter anderem die Statistikprogramme SPSS 12.0 für Windows und Helixtree verwendet (S. 44/Kapitel 2.5.3).

Um einen Überblick über mögliche Assoziationen zwischen Genotypen und Phänotypen zu gewinnen, wurde für jeden SNP getrennt der p-Wert bezüglich der Parameter QTc-Zeit, QT-Dispersion, systolischer und diastolischer Diameter im Echo des linken Ventrikels und Sokolov-Index berechnet.

Von den 17 in der Normalbevölkerung untersuchten SNPs zeigten sechs SNPs signifikante ($p \leq 0,05$) oder hochsignifikante ($p \leq 0,001$) p-Werte bei den untersuchten Parametern. Diese sechs SNPs wurden deshalb auch im Hochrisikokollektiv genotypisiert.

2.5.1 Genetische Statistik

a) Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (benannt nach den Mathematikern G. H. Hardy und Wilhelm Weinberg) ist ein Begriff aus der Populationsgenetik.³⁰

Obwohl das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht einen modellhaften Charakter besitzt, wird es angewandt, um populationsgenetische Gesichtspunkte aus dem Modell für die Realität abzuleiten. Es eignet sich für die Anwendung bei Populationen, die relativ groß sind und sich im Gleichgewicht befinden, und außerdem für die Berechnung des Anteils von heterozygoten Individuen (Aa) bei dominant-rezessiven Erbgängen.³⁰

Das Hardy-Weinberg-Gesetz beschreibt die Verteilung der Allele in einer in der Realität nicht existierenden, idealisierten Population, für die folgende Bedingungen gelten:

1. Panmixie (zufällige Paarung): In einer Population liegt Panmixie vor, wenn die Fortpflanzung durch zufällige Paarung erfolgt („random mating“). Das bedeutet, dass die Paarungen zwischen den Individuen unabhängig von ihrem Genotyp erfolgen. In einer solchen Population liegen die unterschiedlichen Allele in einem Gleichgewichtszustand vor.³¹
2. Die Population ist sehr groß, eigentlich unendlich.
Eine große Population wird vorausgesetzt, da hier der zufällige Verlust eines Individuums oder Gendrift praktisch nicht die Häufigkeit der Allele verändert, was bei einer kleinen Population relativ große Auswirkungen hätte.³⁰
3. Es liegt keine Mutation vor.
4. Es gibt keine Selektion.
Wenn es keine Selektion gibt, bestehen weder Selektionsvorteile noch –nachteile für die Träger bestimmter Gene (Genotypen), die sich phänotypisch auswirken.³⁰
5. Es findet keine Migration statt, die die Allelfrequenz verändert.³¹

Nach einer Runde zufälliger Paarungen findet man in einer Population bestimmte Genotypfrequenzen, die sich in weiteren Fortpflanzungsrunden mit zufälliger Paarung nicht mehr ändern (**Hardy-Weinberg-Gleichgewicht**).³¹

Wenn es zu Veränderungen kommt, dann liegen Abweichungen von den Bedingungen einer idealen Population vor. Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geben Hinweise auf Evolutionsprozesse. Evolution bedeutet, dass sich die Allelfrequenzen in Populationen verändern.

Praktisch alle natürlichen Populationen sind gemäß den Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gesetzes „nicht ideal“, denn sie haben eine endliche Größe und einige Individuen hinterlassen keine Nachkommen. Außerdem geschehen in einer nicht-idealen Population auch Mutationen, welche neue Allele in die Population einführen.

Wendet man das Modell auf die in der vorliegenden Arbeit genotypisierten Populationen an, so bedeutet dies, dass sozusagen Personen „fehlen“, wenn ein SNP nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegt (vergleiche S. 63/Kapitel 3.4.1).

b) Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)

Es ist bekannt, dass die einzelnen Allele von Genen abhängig voneinander auftreten können, wenn die betreffenden Gene in enger räumlicher Nähe auf einem Chromosom beieinander liegen. Dieses Phänomen wird als **Kopplungsungleichgewicht** bezeichnet.³²

Die Entstehung gründet sich darauf, dass eine neue DNA-Variante auf einem Chromosom auftrat, das bereits mehrere andere Sequenzvarianten trug. Zwei Sequenzvarianten befinden sich im Kopplungsungleichgewicht, solange sie überzufällig häufig auf vielen Chromosomen einer Population gemeinsam auftreten.

Bei der Suche nach Genen, die eine Krankheit auslösen oder ihre Entstehung begünstigen, kann man sich den Zusammenhang, der durch das Kopplungsungleichgewicht entsteht, zu Nutze machen. Denn aus dem Wissen über das Vorliegen der ersten Variante kann mit erheblicher Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen der zweiten Variante geschlossen werden. Dadurch ist es möglich, sich bei einer experimentellen Untersuchung auf ausgewählte Varianten zu beschränken, da die übrigen aus den Ergebnissen abgeleitet werden können.³²

Nach diesen Kenntnissen wurden mittels einer statistischen Software aus den 26 Assays, mit denen der erste Teil der MONICA-Augsburg-Population genotypisiert wurde, 17 Assays für die Untersuchung der restlichen Population ausgewählt.

Es ist inzwischen bekannt, dass sich Kopplungsungleichgewichte häufig über ein Vielfaches der ursprünglich angenommenen Distanzen erstrecken. Eine Blockstruktur als zu Grunde liegendes Organisationsmerkmal des menschlichen Genoms wurde als Ursache für diese Diskrepanz identifiziert.³²

Es treten Blöcke auf, in denen ein weit ausgedehntes Kopplungsungleichgewicht vorhanden ist und in denen fast keine Rekombinationen stattgefunden haben. Im Wechsel treten kürzere Regionen auf, in denen nahezu kein Kopplungsungleichgewicht nachweisbar ist und in denen sich nahezu alle Rekombinationen der Populationsgeschichte ereignet haben.

Dadurch dass die Allele verschiedener Polymorphismen abhängig sind, ist innerhalb dieser Blöcke die Zahl an Allelkombinationen stark eingeschränkt. Die beobachteten Kombinationen werden als **Haplotypen** bezeichnet.

Aus diesem Grund wird die Blockstruktur auch **Haplotyp-Blockstruktur** genannt.³²

c) Herstellung der Haplotypen

Bei gegebenen Genotypen stellt die Haplotyp-Rekonstruktion, also die Identifizierung des wahrscheinlichsten Haplotypen eines Individuums, ein statistisches Problem dar. Für die Identifizierung der wahrscheinlichsten Haplotypen stehen verschiedene statistische Verfahren zur Verfügung, z.B. ein „Maximum-Likelihood“-Verfahren unter Verwendung des E-M-Algorithmus (EM: „expectation-maximization“).

Mit dessen Hilfe können unter Hardy-Weinberg-Bedingungen maximum-likelihood Schätzungen von molekularen Haplotyp-Frequenzen vorgenommen werden. Am besten eignet sich der Algorithmus zur Anwendung in großen Stichproben.³³

In diesem Falle wurden die Haplotypen mit dem EM-Algorithmus geschätzt und dann mit den konstruierten Haplotypen die Assoziation berechnet.

2.5.2 Statistische Analyse

Qualitative Merkmale (d.h. nominelle Variablen) wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (χ^2 -Test) ermittelt. Dieser Test dient der Analyse von Häufigkeitsunterschieden und untersucht im einfachsten Fall die Unabhängigkeit zweier Alternativmerkmale. Dem Test liegen eine Stichprobe des Umfangs n zugrunde und die Häufigkeiten, die sich aus der Betrachtung zweier Alternativmerkmale ergeben.³⁴

Quantitative (stetige) Merkmale wurden mit „Oneway-Anova“ ermittelt.

Die LD-Struktur des Gens wurde mittels D' („D prime“) und r^2 („r square“) errechnet.

Um in genetischen Fall-Kontroll-Studien eine Assoziation zu analysieren, werden entweder Allel- oder Genotypverteilung zwischen Fällen und Kontrollen verglichen, indem man aus 2×2 oder 2×3 Kreuztabellen Pearsons' Chi Quadrat Statistik errechnet oder eine Regressionsanalyse durchführt. Als Voraussetzung muss in der untersuchten Kontroll-Population das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bestehen.³⁵

Der Assoziationstest zwischen *cases* und *controls* wurde mit Hilfe einer logistischen Regressionsanalyse durchgeführt. Es wurden das dominante, das rezessive und das „allele dose (trend)“ Modell angewandt.

[1] sei das Allel 1 und [2] das Allel 2, so dass [11] und [22] die homozygoten Genotypen und [12] den heterozygoten Genotyp darstellt.

Mit Hilfe von Odds ratios kann man das relative Risiko abschätzen.

Modell	Allelgruppierung
Allelischer Test	[1] vs. [2]
Dominant	[11] vs. [12] + [22]
Rezessiv	[11] + [12] vs. [22]
Multiplikativ (Additiv)	[11][12][22] trend

Ein Beispiel für eine *case-control* –Tabelle (n = Häufigkeit):

	[11]	[12]	[22]
Case	n1	n2	n3
Control	n4	n5	n6

Ein Beispiel für die Anwendung des dominanten Modells (mit [2] als Risikoallel):

	[11]	[12] + [22]
Case	n1	n2 + n3
Control	n4	n5 + n6

2.5.3 Software

Für die statistischen Analysen wurde SPSS 12.0 für Windows (SPSS Inc., USA) verwendet. Spezielle genetische Analysen, wie z.B. die Berechnung des Kopplungsungleichgewichts, wurden anhand geeigneter webtools durchgeführt:

Name	Art	Anwendung
SPSS 12.0 für Windows	Allgemeine statistische Software	Assoziationstests für MONICA-Augsburg-Population
Helixtree	Statistische Software für Assoziationsanalysen	Assoziationstests für beide Populationen
SDS 2.2	Zuordnung von Genotypen	Allelische Diskriminierung
http://www.hapmap.org/	International HapMap project	LD-Struktur genomweit
http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/	Assoziation und LD-Bestimmung	Bestimmung der LD-Struktur der MONICA-Augsburg-Population
http://genome.ucsc.edu/	UCSC Genome browser	Darstellung im genomischen Kontext
http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl	Web-tool zur Assoziationsberechnung	Berechnung der Quartile und Quintile für ANK2_4447 im Hochrisikokollektiv

Tabelle 5: verwendete Software und web-tools

3 Ergebnisse

3.1 Überblick

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus der MONICA-Augsburg-Population dargestellt.

Betrachtet werden Assoziationen der einzelnen SNPs mit den Parametern QTc-Zeit (korrigierte QT-Zeit), QT-Dispersion, linksventrikulärer endsystolischer Diameter (Abkürzung: LVEDS), linksventrikulärer enddiastolischer Diameter (Abkürzung: LVEDD) und Sokolov-Index. Die p-Werte, die mögliche Assoziationen zwischen SNP und jeweiligem Parameter verdeutlichen sollen, wurden nicht nur für jeden SNP einzeln berechnet, sondern es wurde ein Verfahren angewandt, mit Hilfe dessen die SNPs für die Berechnung der p-Werte auch paarweise, in 3er-Gruppen und in 4er-Gruppen zusammengefasst wurden.

Im Anschluss daran werden die Allelfrequenzen und die Haplotypfrequenzen aufgeführt.

Zunächst soll jedoch die LD-Struktur des Gens veranschaulicht werden.

3.2 LD-Struktur des Ankyrin B Gens

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde das Kopplungsungleichgewicht innerhalb des Ankyrin B berechnet. Dieses spiegelt das Ausmaß wider, mit welchem zwei benachbarte Allele miteinander vererbt werden. Ein Maß dafür stellt D' dar: Dieses Maß kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei das Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei benachbarten Markern umso größer ist, je größer auch der Zahlenwert ist. D.h. ein Wert von 1 spricht dafür, dass die Marker zu 100% gekoppelt vorliegen (zu 100% miteinander vererbt werden), bei einem Wert von 0 liegen die Marker hingegen zu 0% gekoppelt vor (sie werden also nicht zusammen vererbt).

Folgende Grafik veranschaulicht das Kopplungsungleichgewicht D' zwischen den einzelnen Markern:

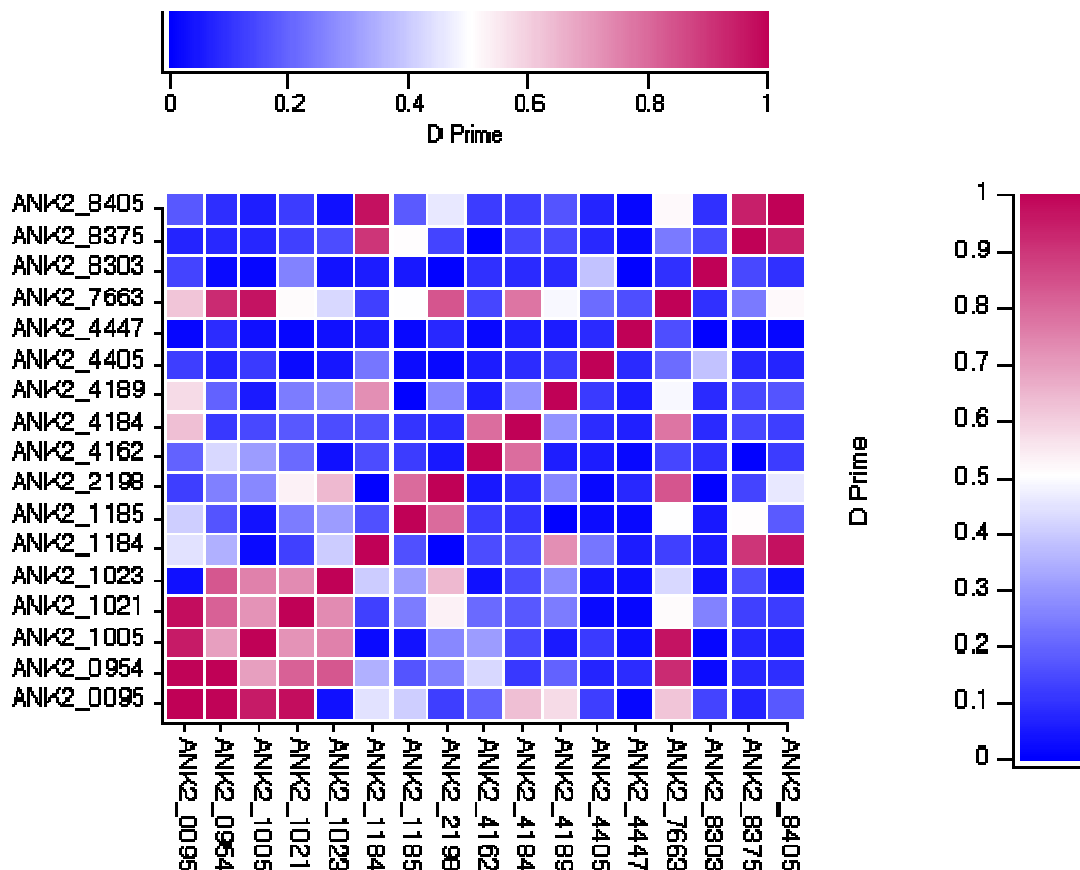


Abbildung 20: Kopplungsungleichgewicht D' in der MONICA-Augsburg-Population

Die farbliche Kennzeichnung verdeutlicht die Werte für D' : Werte gegen 1, die für ein hohes Maß an Kopplungsungleichgewicht sprechen, sind rot markiert, und Werte gegen 0, die auf ein niedriges Maß an Kopplungsungleichgewicht hindeuten, sind blau markiert. Die Farbe weiß spiegelt Werte wider, die zwischen 0 und 1 liegen.

Aus der Grafik wird ersichtlich, dass v. a. in den „vorderen“ Abschnitten des Gens, in denen die untersuchten SNPs vergleichsweise eng zusammen liegen, ein hohes Maß an Kopplungsungleichgewicht auftritt. Zum Beispiel erreichen die SNPs ANK2_0095 und ANK2_0954 einen Wert von $D' = 1$. Auch die benachbarten SNPs ANK2_1005 und ANK2_1021 weisen beide zu ANK2_0095 hohe Werte für D' auf. Die SNPs ANK2_8375 und ANK2_8405, die sich im Gen weiter „hinten“ befinden, weisen ebenfalls hohe Werte für D' auf.

3.3 Ergebnisse MONICA-Augsburg-Population

3.3.1 QTc-Zeit

Um Assoziationen zwischen der QTc-Zeit und den 17 SNPs aufzudecken, wurden die jeweiligen p-Werte berechnet. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ besteht ein signifikanter Zusammenhang, bei einem p-Wert $\leq 0,001$ spricht man von einem hochsignifikanten Zusammenhang. Folgende Grafik liefert einen Überblick:

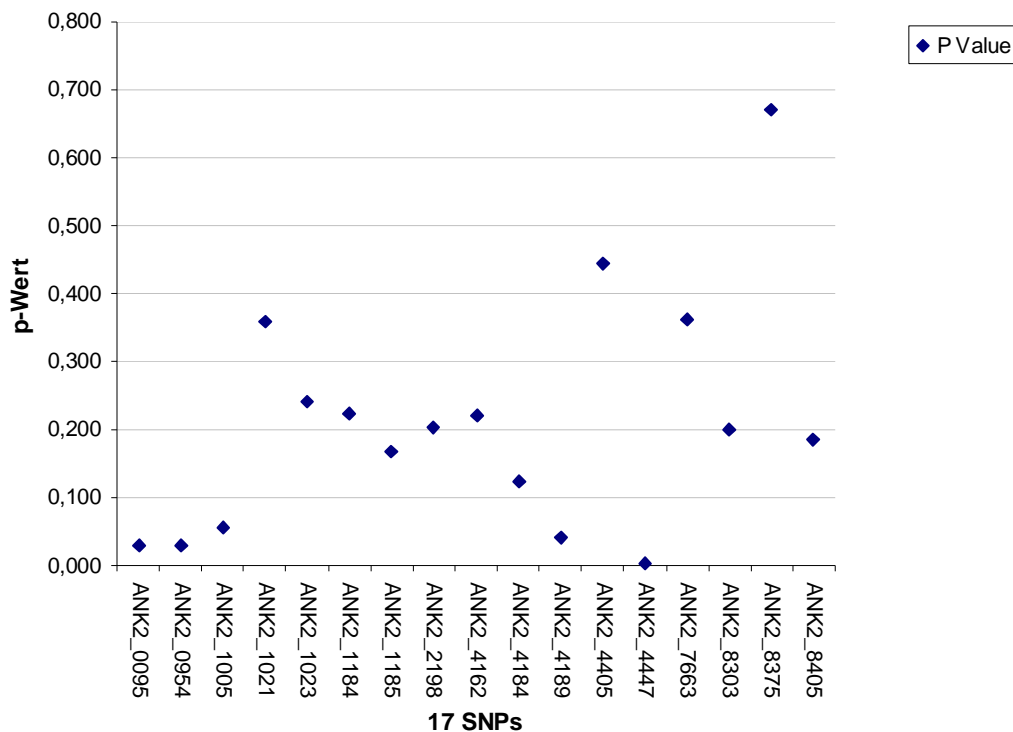


Abbildung 21: 17 SNPs und p-Werte

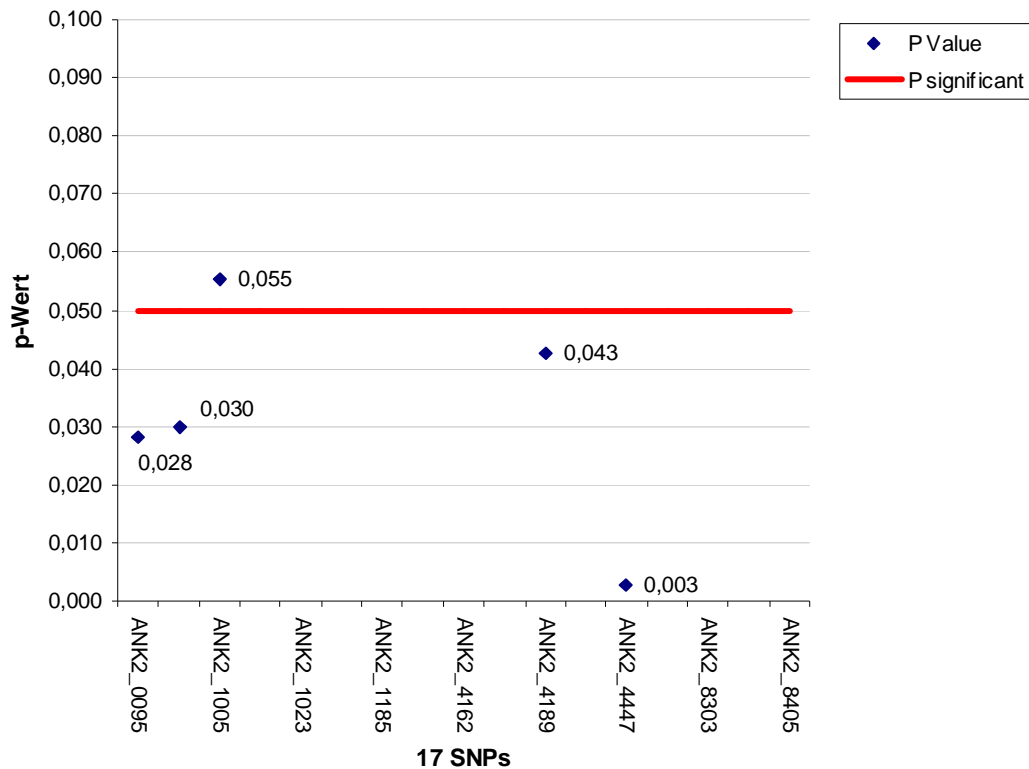


Abbildung 22: signifikante p-Werte

Bei den SNPs ANK2_0095, ANK2_0954, ANK2_4189 und ANK2_4447 besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der QTc-Zeit.

Eine anschauliche Darstellung liefert die nächste Grafik. Hier wurde $-\log_{10}aP$ berechnet, d.h. je kleiner der p-Wert, desto kleiner auch der Wert für aP (ein anderer p-Wert in der Statistik), desto höher der Ausschlag der Kurve. Da der SNP ANK2_4447 mit der QTc-Zeit den kleinsten p-Wert besitzt (und somit den kleinsten Wert für aP), erwartet man dort dementsprechend den höchsten Punkt der Kurve.

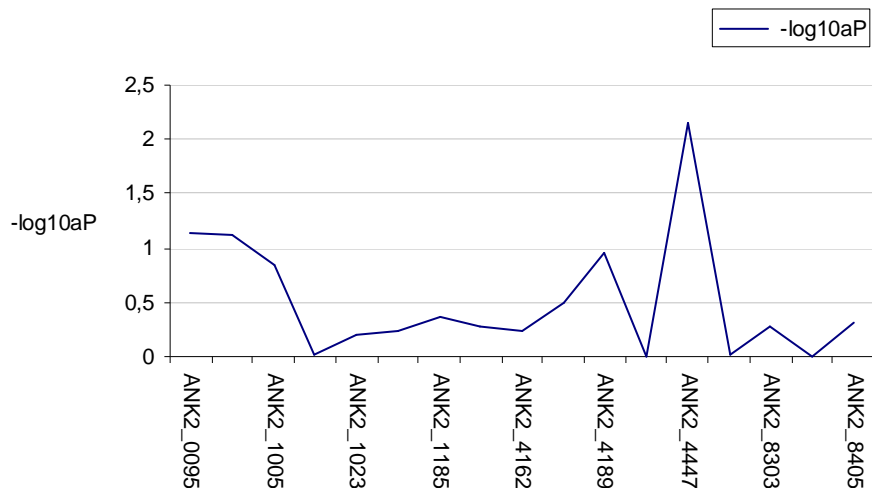


Abbildung 23: QTc_ANK2_MONI_SNPs

Da die einzelnen SNPs zum Teil gekoppelt vererbt werden, ist es sinnvoll, nicht nur die p-Werte für die Assoziation des einzelnen SNP mit den verschiedenen EKG-Parametern zu berechnen, sondern benachbarte SNPs paarweise zu betrachten. In folgender Grafik wurde dies verwirklicht: Zwei benachbarte SNPs wurden zusammengefasst und ihr gemeinsamer p-Wert berechnet. Für die grafische Darstellung wurde wieder $-\log_{10}aP$ berechnet.

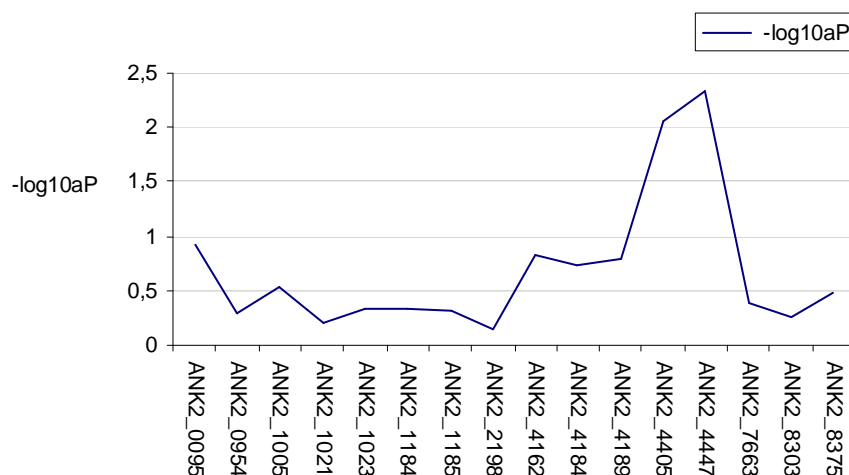


Abbildung 24: QTc_ANK2_MONI_2erHaplo

Beispiel: Der Kurvenpunkt für ANK2_0095 gibt den gemeinsamen p-Wert der beiden SNPs ANK2_0095 und ANK2_0954 wieder, der Punkt an der Stelle ANK2_0954 gibt den gemeinsamen p-Wert für ANK2_0954 und ANK2_1005 wieder usw.

Im Bereich ANK2_4405 (der hier ANK2_4405 und ANK2_4447 darstellt) und im Bereich ANK2_4447 (der hier ANK2_4447 und ANK2_7663 darstellt) finden sich signifikante p-Werte ($p = 0,009$ bzw. $p = 0,005$).

Zusätzlich wurden die SNPs analog den erwähnten Verfahren in 3er und 4er Gruppen zusammengefasst. Auch unter dieser Anwendung bestätigten sich die beschriebenen Ergebnisse.

Diejenigen vier SNPs, die einen signifikanten Zusammenhang mit der QTc-Zeit zeigten, werden getrennt voneinander betrachtet.

ANK2_0095 ($p = 0,028$):

Die folgende Abbildung verdeutlicht die Verteilung der Genotypen im Bezug zur QTc-Zeit. Auf der Rubrikenachse x sind die Genotypen aufgeführt, auf der Größenachse y die QTc-Zeit ins ms und auf der zweiten Größenachse y die Anzahl der Probanden. Für jeden Genotyp wurde jeweils der Mittelwert aus der zugehörigen QTc-Zeit berechnet (hier jeweils als graue Säule dargestellt). Dieses Schema zieht sich durch die folgenden Abbildungen.

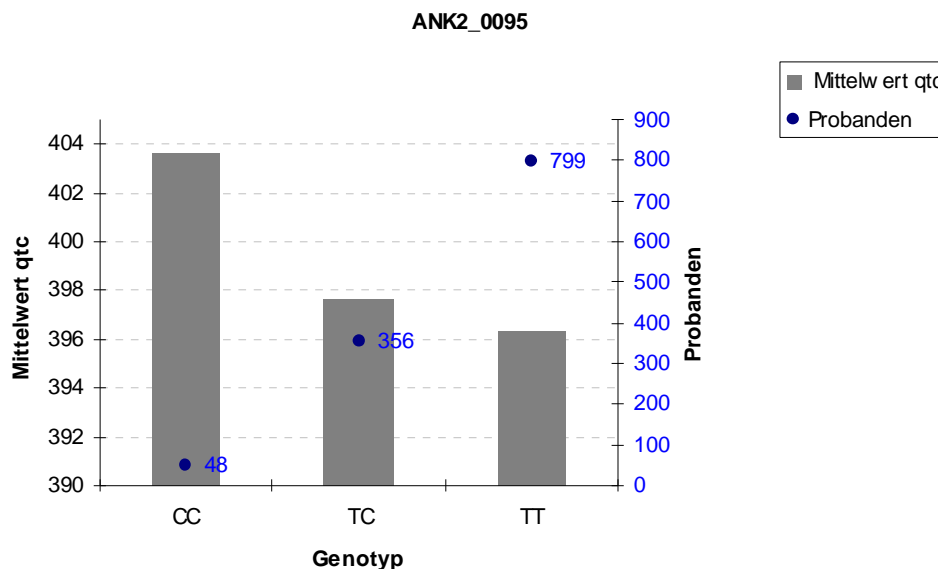


Abbildung 25: ANK2_0095 mit QTc

ANK2_0954 ($p = 0,03$):

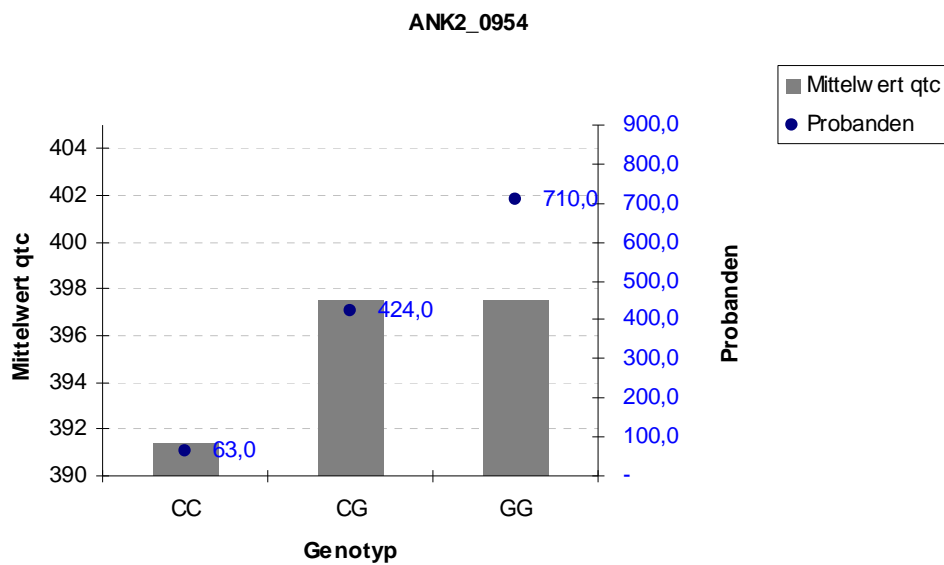


Abbildung 26: ANK_0954 mit QTc

ANK2_4189 ($p = 0,043$):

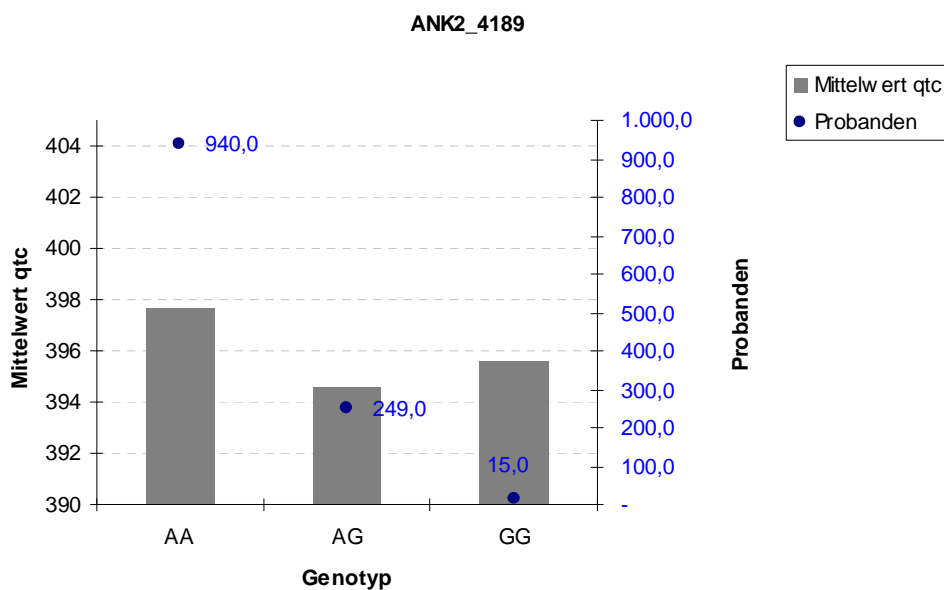


Abbildung 27: ANK2_4189 mit QTc

ANK2_4447 (p = 0,003):

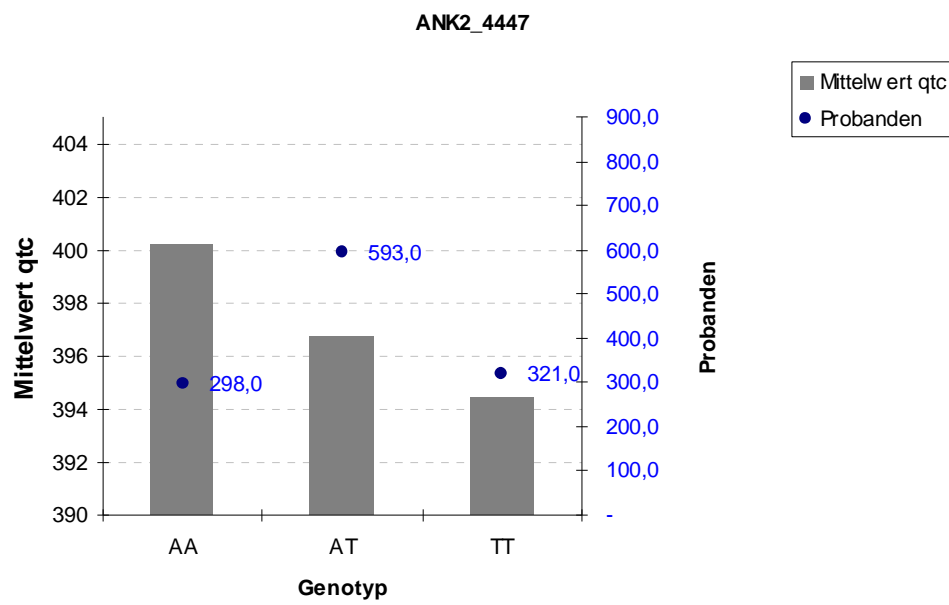


Abbildung 28: ANK2_4447 mit QTc

3.3.2 QT-Dispersion

Bezüglich der QT-Dispersion zeigten zwei SNPs einen signifikanten Zusammenhang: ANK2_1184 ($p=0,003$) und ANK2_4447 ($p=0,026$).

Hier wurde das gleiche Verfahren wie unter 3.3.1 angewendet: Es wurden die SNPs paarweise und zu 3er Gruppen mit benachbarten SNPs zusammengefasst und der p-Wert berechnet. Bei beiden Verfahren sind die p-Werte nicht mehr signifikant. Die beiden signifikanten SNPs sollen jedoch getrennt voneinander betrachtet werden. Wie bereits unter 3.3.1 dargestellt werden in gleicher Weise die Verteilung der Genotypen und die Mittelwerte der QT-Dispersion berechnet.

ANK2_1184 ($p = 0,003$):

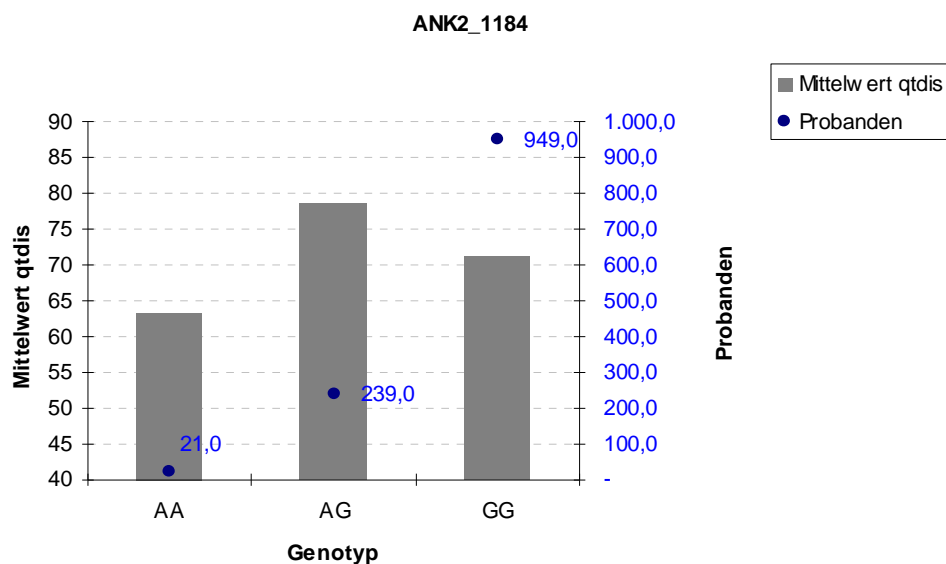


Abbildung 29: ANK2_1184 mit QT-Dispersion

Auf der Rubrikenachse x sind die Genotypen aufgeführt, auf der Größenachse y die QT-Dispersion in ms, auf der zweiten Größenachse y die Anzahl der Probanden. Die blauen Punkte entsprechen jeweils der Anzahl der Probanden, die den jeweiligen Genotyp tragen.

ANK2_4447 ($p = 0,026$):

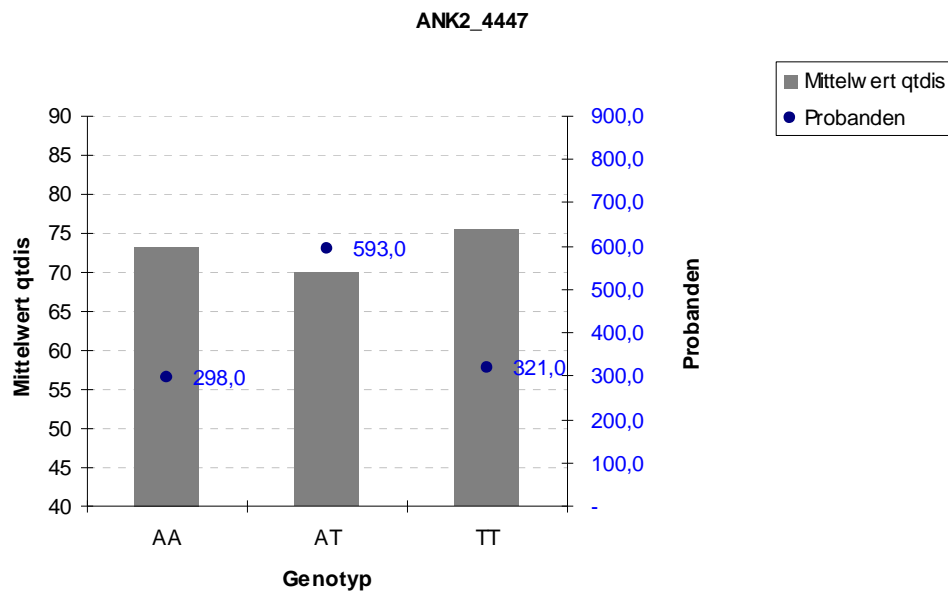


Abbildung 30: ANK2_4447 mit QT-Dispersion

3.3.3 LVESD

Bei der Berechnung der p-Werte, die Assoziationen zwischen SNP und linksventrikulärem endsystolischem Diameter (LVESD) widerspiegeln, zeigten drei SNPs signifikante Zusammenhänge:

ANK2_0095 ($p = 0,04$), ANK2_1023 ($p = 0,04$) und ANK2_7663 ($p = 0,005$).

Der Haplotyp C_A_G besitzt einen p-Wert von **0,003**: Dies bedeutet, dass sich unter der Annahme, dass im SNP ANK2_0095 ein C, in ANK2_1023 ein A und in ANK2_7663 ein G befindet, ein p-Wert von 0,003 errechnet.

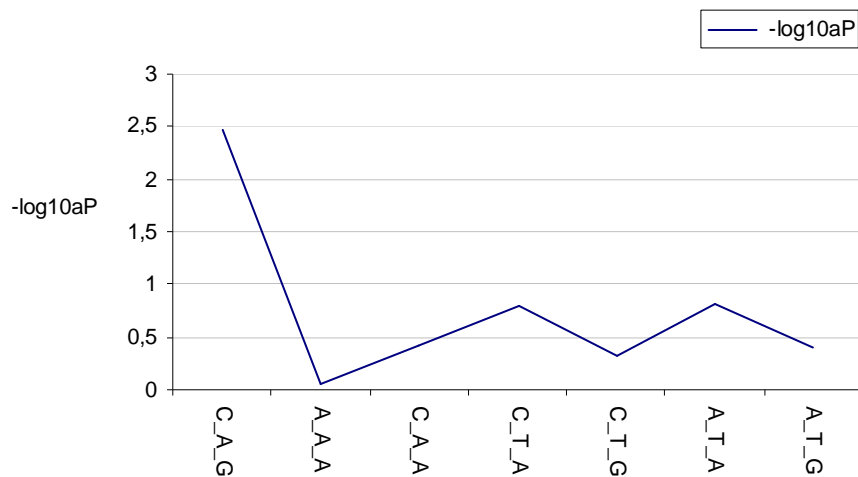


Abbildung 31: Assoziation LVESD
 Rubrikenachse x: Haplotypen, Größenachse y: -log 10 aP

Die drei SNPs mit signifikanten p-Werten und ihr Bezug zum linksventrikulären endsystolischen Diameter (LVESD) werden analog zu den vorhergehenden Kapiteln nochmals separat dargestellt.

ANK2_0095 ($p = 0,04$):

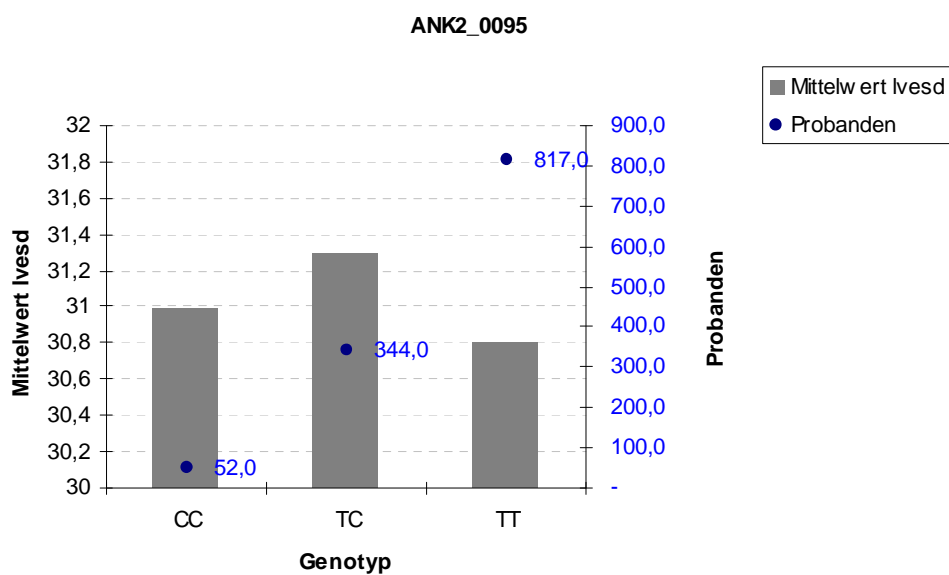


Abbildung 32: ANK2_0095 und lvesd

ANK2_1023 ($p = 0,04$):

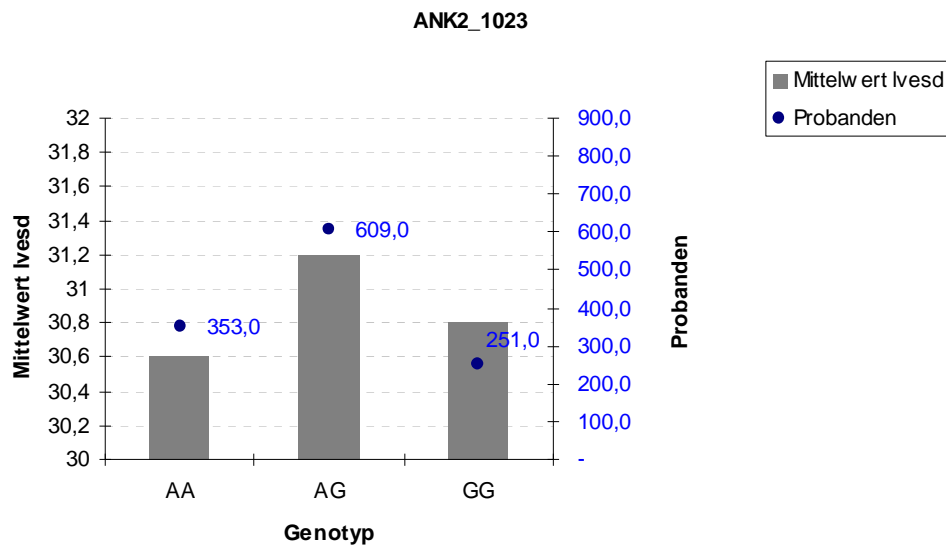


Abbildung 33: ANK2_1023 und lvsd

ANK2_7663 ($p = 0,005$):

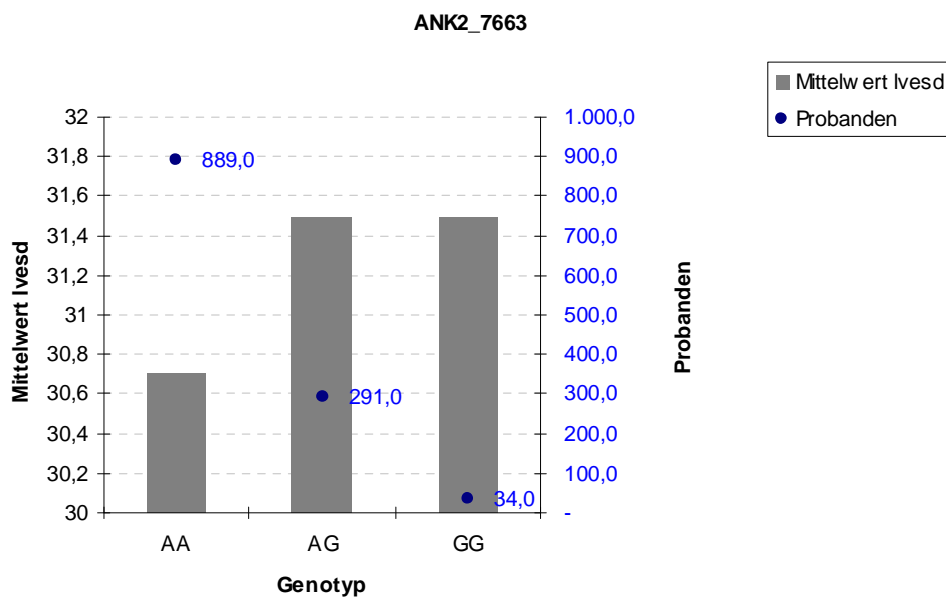


Abbildung 34: ANK2_7663 und lvsd

3.3.4 LVEDD

Die Berechnung der p-Werte zwischen Genotypen und linksventrikulärem enddiastolischem Diameter (Abkürzung: LVEDD) lieferte keine signifikanten Ergebnisse.

Ergo gibt es zwischen keinem der untersuchten SNPs und dem LVEDD einen signifikanten Zusammenhang.

3.3.5 Sokolov-Index

Für die Berechnung der p-Werte hinsichtlich möglicher Assoziationen zwischen Sokolov-Index und SNP wurden die p-Werte nicht für jeden SNP einzeln berechnet, sondern für die zu 2er- und 3er- Gruppen zusammengefassten SNPs.

In beiden Fällen wurde kein signifikantes Ergebnis gefunden, was darauf hinweist, dass der Sokolov-Index in keinem Zusammenhang zu den genotypisierten SNPs steht.

3.3.6 Allelfrequenzen und Haplotypen

Die für das Protein Ankyrin B kodierende DNA wurde in der MONICA-Augsburg-Population mit 17 Assays genotypisiert. Eine Übersicht über die an den jeweiligen SNPs lokalisierten Allele liefert die folgende Tabelle:

Marker	Allele	Allele Count	Allele Freq
ANK2_0095	C	551	0,188
ANK2_0095	T	2383	0,812
ANK2_0954	G	2242	0,768
ANK2_0954	C	676	0,232
ANK2_1005	C	2095	0,714
ANK2_1005	A	841	0,286
ANK2_1021	A	1416	0,485
ANK2_1021	T	1502	0,515
ANK2_1023	A	1601	0,545
ANK2_1023	G	1335	0,455
ANK2_1184	A	344	0,116
ANK2_1184	G	2610	0,884
ANK2_1185	A	1938	0,659
ANK2_1185	G	1004	0,341
ANK2_2198	A	1921	0,653
ANK2_2198	G	1019	0,347
ANK2_4162	A	1413	0,482
ANK2_4162	G	1517	0,518
ANK2_4184	T	2561	0,878
ANK2_4184	C	355	0,122
ANK2_4189	A	2598	0,884
ANK2_4189	G	340	0,116
ANK2_4405	C	1177	0,404
ANK2_4405	T	1739	0,596
ANK2_4447	A	1457	0,492
ANK2_4447	T	1503	0,508
ANK2_7663	G	442	0,15
ANK2_7663	A	2496	0,85
ANK2_8303	A	2615	0,889
ANK2_8303	G	327	0,111
ANK2_8375	T	2373	0,804
ANK2_8375	C	577	0,196
ANK2_8405	A	975	0,33
ANK2_8405	T	1981	0,67

Tabelle 6: Verteilung der Allele in der MONICA-Augsburg-Population

Da es zum Teil bei der Genotypisierung nicht möglich war, manche „Undetermined“ eindeutig VIC, FAM oder BOTH zuzuweisen, mussten diese Signale als „Undetermined“ unbestimmt bleiben. Diese wurden hier nicht mitgezählt, deshalb ergibt vereinzelt die Summe der Allele unter „Allele Count“ nicht bei jedem SNP den gleichen Wert.

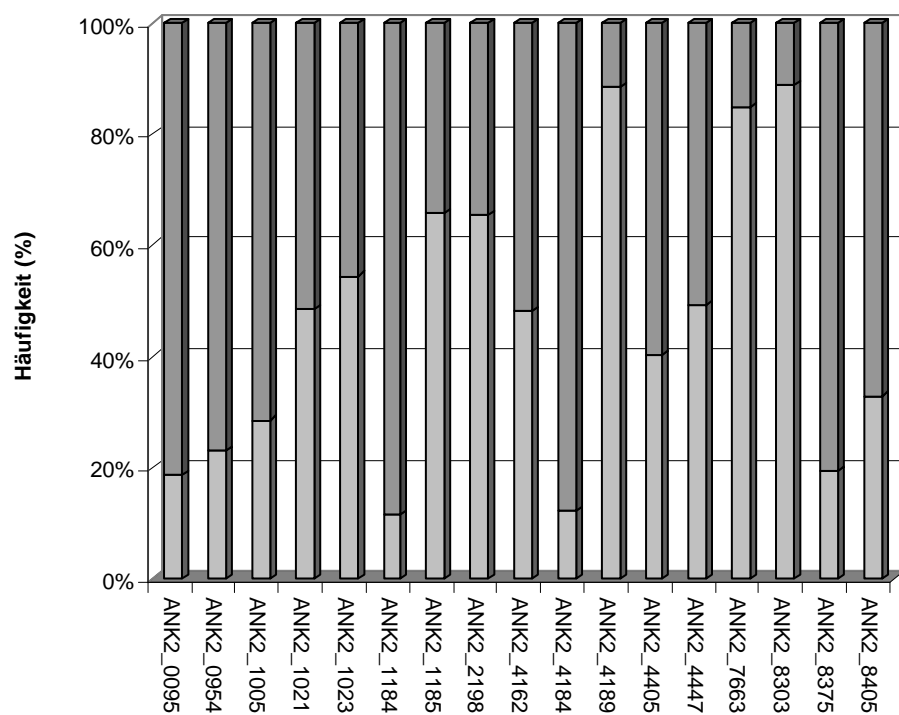


Abbildung 35: Verteilung von seltenem und häufigem Allel in den einzelnen SNPs
 Rubrikenachse x: 17 SNPs, Größenachse y: Häufigkeit (Angabe in Prozent)

3.3.7 ANK2_4447: Quartile

Der SNP ANK2_4447 hatte in der MONICA-Augsburg-Population einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der QTc-Zeit ($p=0,003$).

Bestimmte Studien zeigen, dass Leute mit längerer QT-Zeit ein höheres Risiko haben, eine Rhythmusstörung zu entwickeln.

Um einem solchen Sachverhalt näher auf den Grund zu gehen, muss man ein geeignetes statistisches Verfahren anwenden. Dieses besteht darin, die Population hinsichtlich der Phänotypen in vier Gruppen zu gliedern und die beiden Gruppen mit den Extremwerten miteinander zu vergleichen.

In diesem Fall wurden die Probanden der MONICA-Augsburg-Population je nach Länge ihrer QTc-Zeit in vier Gruppen unterteilt und anschließend die Probanden mit langer QTc-Zeit mit den Probanden mit kurzer QTc-Zeit verglichen, was in weitestem Sinne einer Fall-Kontroll-Studie entspricht. Diese Methode wurde sowohl für die Gesamtpopulation („Gesamt 1 vs 4“) als auch für Männer („Männer 1 vs 4“) und Frauen („Frauen 1 vs 4“) getrennt angewandt.

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)		
	Controls	Cases	allele freq. difference	allele positivity	Armitage's trend test
Gesamt_1vs4	n11=55 (57.75) n12=155 (149.50) n22=94 (96.75) f_a1=0.44 +/-0.020	n11=91 (90.20) n12=147 (148.60) n22=62 (61.20) f_a1=0.55 +/-0.020	[2]<->[1] P=0.00009	Risk allele 1 [11+12]<->[22] p=0.00399	p=0.00009
Maenner_1vs4	n11=27 (28.84) n12=81 (77.33) n22=50 (51.84) f_a1=0.43 +/-0.027	n11=49 (46.07) n12=71 (76.87) n22=35 (32.07) f_a1=0.55 +/-0.029	p=0.00316 [2]<->[1] P=0.00316	p=0.00273 Risk allele 1 [11+12]<->[22] p=0.07142	p=0.00359 p=0.00359
Frauen_1vs4	n11=28 (28.94) n12=74 (72.12) n22=44 (44.94) f_a1=0.45 +/-0.029	n11=42 (44.14) n12=76 (71.72) n22=27 (29.14) f_a1=0.55 +/-0.028	P=0.01018 (P) [2]<->[1] P=0.01018 (P)	p=0.05080 Risk allele 1 [11+12]<->[22] p=0.02219	p=0.00904 p=0.00904

Tabelle 7: ANK2_4447 und Quartile

Erläuterung: Als Risikoallel soll das Allel 1 definiert werden, da es bei den cases häufiger vorkommt. Der *risk genotype* wäre somit 11. „f_a1“ gibt die Allelfrequenz in Prozent +/- Standardabweichung an.

In den Spalten *controls* und *cases* sind die Frequenzen der Genotypen aufgeführt (n11 und n22 = homozygot, n12 = heterozygot).

Allele frequency difference bezeichnet einen genetischen Assoziationstest (Odds ratio). Anders ausgedrückt: Es wurde eine 2*2 Kreuztabelle berechnet, in der nicht Individuen mit ihren Genotypen vorkommen, sondern die Allele.

Im *Allele positivity* Test wird in einer 2x2 Tabelle das dominante (hier 11+12 versus 22) und das rezessive (hier 11 versus 12+22) Modell simuliert.

Der *Cochran-Armitage trend test* geht von einer additiven Wirkung der Genotypen aus, in diesem Fall bedeutet dies: Die korrigierte QT-Zeit ist umso länger je mehr vom Allel 1 vorhanden ist (11>12>22).

Wie man sieht, finden sich von wenigen Ausnahmen abgesehen überwiegend signifikante bis hochsignifikante p-Werte. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Allel mit einer langen QTc-Zeit und das andere Allel mit einer kurzen QTc-Zeit verbunden ist.

3.4 Ergebnisse Hochrisikokollektiv: „cases and controls“

In Kapitel 2.2.2 („Hochrisikokollektiv“) wurde bereits erläutert, wie sich die genotypisierte Population zusammensetzt: aus Probanden mit koronarer Herzkrankheit oder dilatativer Cardiomyopathie, die einen Defibrillator bekommen hatten (im Folgenden als *cases* bezeichnet). Die als Kontrolle bestimmten Probanden mit koronarer Herzkrankheit hatten keinen Defibrillator (im Folgenden *controls* genannt).

Hier nochmals eine Darstellung des Kopplungsungleichgewichts D' , diesmal nur für die sechs im Hochrisikokollektiv untersuchten SNPs:

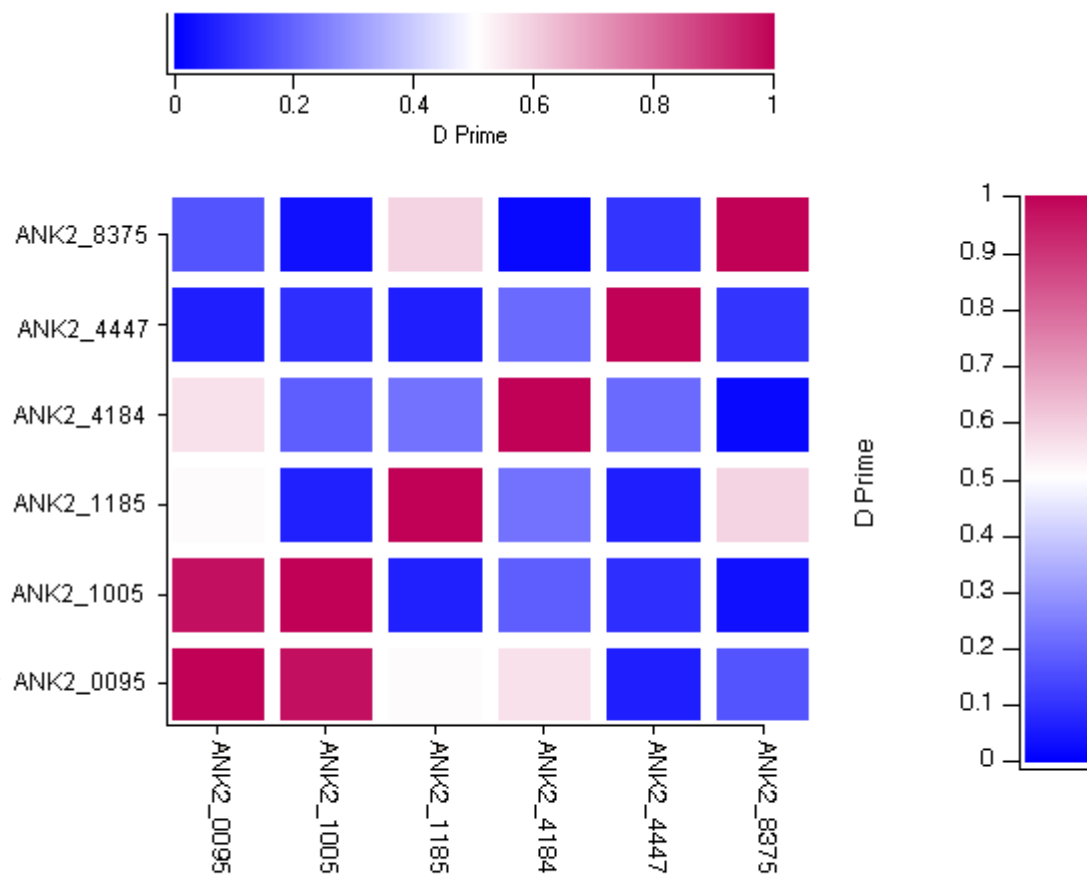


Abbildung 36: Kopplungsungleichgewicht für die sechs im Hochrisikokollektiv untersuchten SNPs

3.4.1 Vergleich mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Interessanterweise liegen die Probanden aus der Gruppe der cases, d.h. die Probanden mit Defibrillator, **nicht** im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, denn der SNP ANK2_4447 fällt deutlich heraus (siehe folgende Grafik):

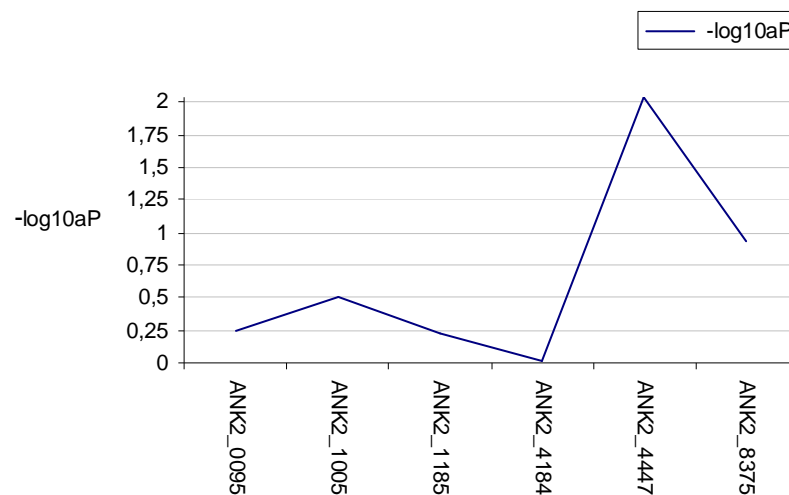


Abbildung 37: Vergleich mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Als Ursache für eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht gibt es mehrere Faktoren. Zum Beispiel könnte Selektion, also eine langsame Veränderung des Genpools durch Fortpflanzungsunterschiede, für eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verantwortlich sein. Am wahrscheinlichsten ist in diesem Fall jedoch das Vorliegen einer Spontanmutation, d.h. eine nicht-stumme Mutation, die nicht repariert und anschließend der Selektion unterworfen wurde.

3.4.2 Verteilung der Allele

In diesem Kapitel werden die sechs genotypisierten SNPs getrennt voneinander betrachtet.

ANK2_0095:

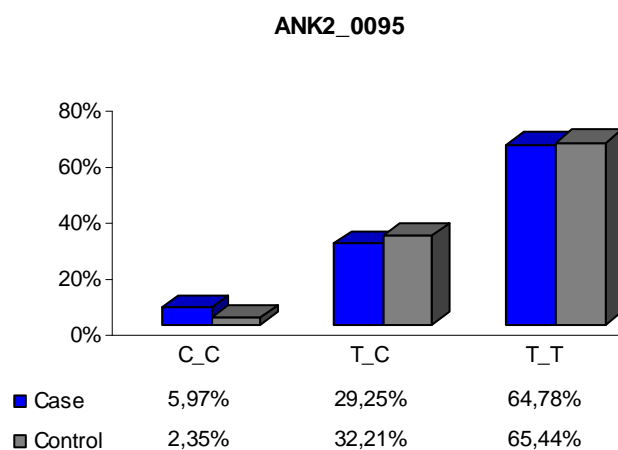


Abbildung 38: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_0095 in der Gruppe der cases und in der Gruppe der controls

ANK2_1005:

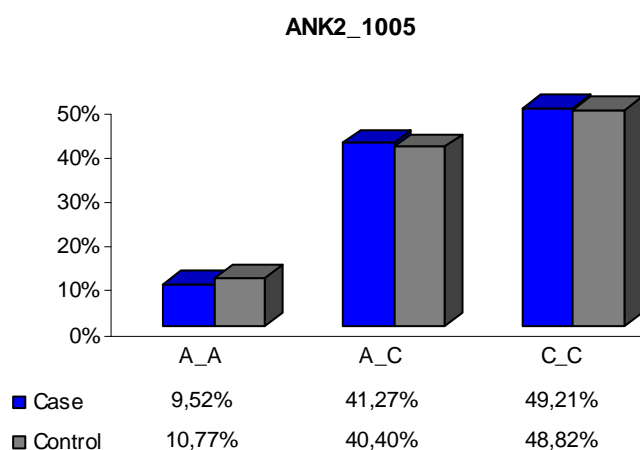


Abbildung 39: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_1005 in der Gruppe der cases und in der Gruppe der controls

ANK2_1185:

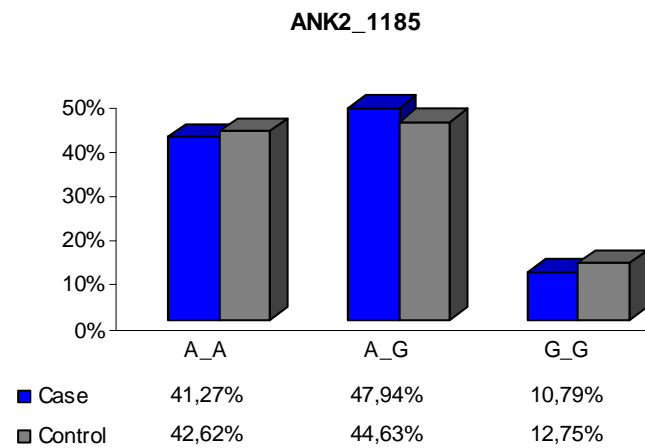


Abbildung 40: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_1185 in der Gruppe der cases und in der Gruppe der controls

ANK2_4184:

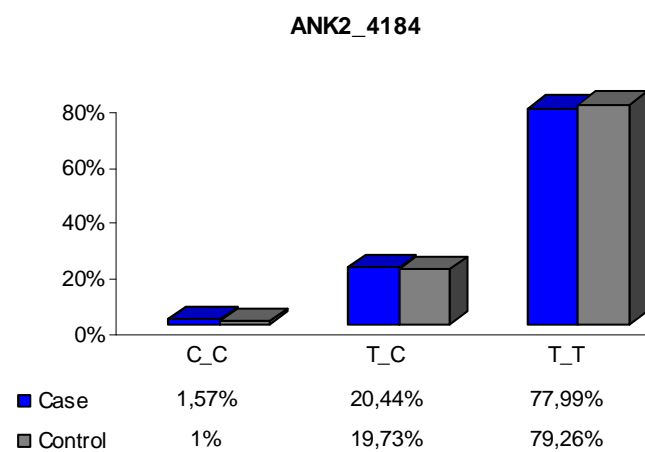


Abbildung 41: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_4184 in der Gruppe der cases und in der Gruppe der controls

ANK2_8375:

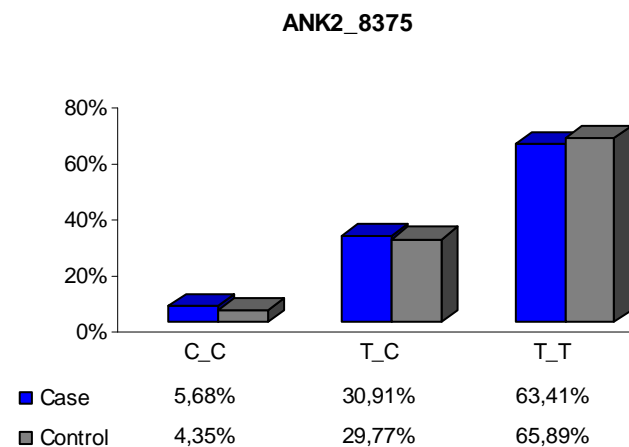


Abbildung 42: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_8375 in der Gruppe der cases und in der Gruppe der controls

ANK2_4447:

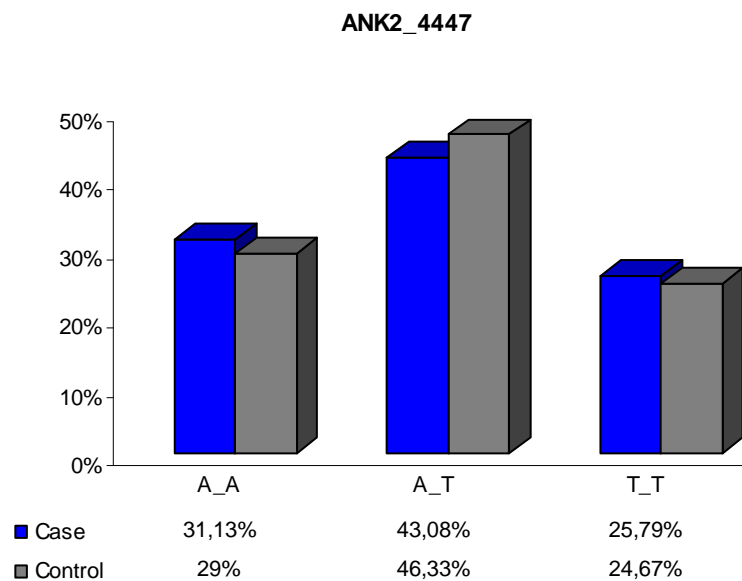


Abbildung 43: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_4447 in der Gruppe der cases und in der Gruppe der controls

3.4.3 Assoziation zum ICD

Hier besteht offensichtlich ein signifikanter Unterschied zwischen *cases* und *controls* und ANK2_0095. Die anderen fünf SNPs zeigten hier keine relevanten p-Werte.

Die p-Werte in der Tabelle beziehen sich auf den Vergleich *cases-controls*.

Variable	P Value
ANK2_0095	0,026
ANK2_1005	0,577
ANK2_1185	0,401
ANK2_4184	0,541
ANK2_4447	0,443
ANK2_8375	0,52

Tabelle 8: Assoziation ANK2_ICD

3.4.4 Allelfrequenzen

Zur Veranschaulichung der Allelfrequenzen in der Gruppe der *cases* dient die nachstehend aufgeführte Tabelle.

Marker	Allele	Allele Count	Allele Freq
ANK2_0095	T	991	0,804
ANK2_0095	C	241	0,196
ANK2_1005	A	374	0,306
ANK2_1005	C	850	0,694
ANK2_1185	A	798	0,651
ANK2_1185	G	428	0,349
ANK2_4184	T	1094	0,887
ANK2_4184	C	140	0,113
ANK2_4447	A	648	0,524
ANK2_4447	T	588	0,476
ANK2_8375	T	983	0,798
ANK2_8375	C	249	0,202

Tabelle 9: Verteilung der Allele im Hochrisikokollektiv

4 Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten in der Bundesrepublik Deutschland als die häufigste Todesursache und nehmen eine dementsprechend große Bedeutung ein.

Betrachtet man die Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen, so liegen ischämische Herzerkrankungen an erster Stelle. Diese führen häufig zu letalen ventrikulären Arrhythmien. Neben unterschiedlichen Faktoren wie Alter, Geschlecht und linksventrikulärer Funktion spielt wahrscheinlich der genetische Hintergrund eine gewisse Rolle, dessen Bedeutung Ziel genetischer Studien ist. Solche Studien befassen sich oft mit der Erforschung allelischer Varianten als mögliche Einflussgröße für das Risiko, einen plötzlichen Herztod zu erleiden.

Vom plötzlichen Herztod können jedoch auch scheinbar gesunde Personen betroffen sein. Man hat herausgefunden, dass vielen dieser Todesfälle ein angeborenes Long-QT-Syndrom zugrunde liegt, das die Entstehung ventrikulärer Arrhythmien begünstigt.

Das LQTS 4, das durch Veränderungen im Strukturprotein Ankyrin B hervorgerufen wird, ist nur eine Form davon.

Die Funktionen dieses Proteins sind bereits bekannt: Es verankert bestimmte Intramembranproteine, wie z.B. Ionenkanäle und Austauscherpumpen, und interagiert mit diesen, wodurch es indirekt an der Erregungsausbreitung und Erregungsrückbildung im Herzen beteiligt ist.

Doch bislang war unklar, welche Auswirkungen Ankyrin B auf die Repolarisation, Herzmorphologie und linksventrikuläre Funktion in der Normalbevölkerung hat, und ob es in der Verteilung und Häufigkeit der für dieses Protein kodierenden DNA-Abschnitte zwischen gesunden Probanden und Probanden mit struktureller Herzerkrankung Unterschiede gibt.

Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei Ziele:

Zum einen sollten ausgewählte Abschnitte in den für das Protein Ankyrin B kodierenden DNA-Abschnitten bei gesunden Probanden untersucht werden, um die Verteilung der SNPs zu testen und mögliche Assoziationen zu bestimmten EKG-Parametern zu erforschen.

Zum anderen sollten sechs ausgewählte SNPs zusätzlich in einem Hochrisikokollektiv genotypisiert werden. Es galt anschließend, die Verteilung und Häufigkeit der Allele in diesen sechs SNPs zwischen beiden Populationen zu vergleichen.

Als repräsentative Stichprobe aus der Normalbevölkerung wurde die MONICA-Augsburg-Population verwendet. Insgesamt wurden 17 SNPs aus den kodierenden Abschnitten der DNA dieser gesunden Probanden mit dem TaqMan[®] genotypisiert.

Mit der TaqMan[®] Methode kann eine Genotypisierung großer Populationen relativ einfach und schnell durchgeführt werden. Die Firma Applied Biosystems stellt über 150.000 validierte

SNP Assays für die meisten Gene im menschlichen Genom zur Verfügung.³⁶ In dieser Arbeit wurden die Assays-on-DemandTM verwendet, das sind 5'-Nuklease-Assays mit TaqMan[®] Proben und Primern.³⁶ Neben den früher verwendeten Assays by Design erlauben Assays on Demand eine bequeme Form der Genotypisierung. Die Assays können bei der Firma bestellt werden und sind innerhalb weniger Tage verfügbar.

Mit der TaqMan[®] Analyse erfolgte auch die Genotypisierung der zweiten Population. Dieses Hochrisikokollektiv bestand aus Probanden mit struktureller Herzerkrankung, denen in der Vorgeschichte ein Defibrillator implantiert wurde. Als Vergleichsgruppe wurden Probanden mit koronarer Herzkrankheit verwendet, denen bislang kein Defibrillator implantiert worden war.

Mit einer geeigneten Software wurden die Ergebnisse der Genotypisierung aus der Normalbevölkerung in Hinblick auf Assoziationen zu den fünf EKG-Parametern QTc-Zeit, QT-Dispersion, linksventrikulärer endsystolischer und enddiastolischer Diameter und Sokolov-Index untersucht.

Anschließend wurden die Allelverteilungen derjenigen sechs SNPs, die in beiden Populationen genotypisiert worden waren, miteinander verglichen.

Die statistische Auswertung der in der MONICA-Augsburg-Population genotypisierten SNPs lieferte einige signifikante Assoziationen zwischen QTc-Zeit, QT-Dispersion, linksventrikulärem endsystolischem Diameter und bestimmten SNPs.

So fanden wir in der MONICA-Augsburg-Population vier SNPs, die aufgrund ihrer signifikanten p-Werte anscheinend in Zusammenhang mit der QTc-Zeit stehen: ANK2_0095 (S. 50/Kapitel 3.3.1), ANK2_0954 (S. 51/Kapitel 3.3.1), ANK2_4189 (S. 51/Kapitel 3.3.1) und ANK2_4447 (S. 52/Kapitel 3.3.1).

Vereinfacht ausgedrückt ist bei allen vier SNPs die QTc-Dauer umso kürzer bzw. umso länger, je „mehr“ von einem Allel vorhanden ist. Dieses Phänomen bezeichnet man als „gene-dose-effect“.

Im Falle von ANK2_4447 bedeutet dies, dass die Probanden mit dem homozygoten Genotyp AA im Vergleich zum heterozygoten Genotyp AT eine längere QTc-Zeit haben, wohingegen diejenigen mit TT im Mittel die kürzeste QTc-Zeit haben. Man könnte also sagen, dass gemäß dem „gene-dose-effect“ die QTc-Dauer umso länger ist, je „mehr“ A vorhanden ist.

Was Assoziationen zwischen genetischen Varianten im Ankyrin B Gen und der Dauer des QT-Intervalls bei herzgesunden Personen (in der Normalbevölkerung) betrifft, gibt es auf diesem Gebiet derzeit keine vergleichbaren Studien.

Allerdings entdeckten im Jahre 2006 Amy R. Mank-Seyour et al. vier neue Mutationen im Gen für Ankyrin B, die womöglich mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Torsades de pointes Tachykardien assoziiert sind.³⁷

Mit Varianten im Ankyrin B Gen bei nicht-gesunden Probanden befasst sich eine aktuelle Studie von Peter J. Mohler et al.

Anhand umfassender Untersuchungen gelang es ihnen, bei unterschiedlichen Probandengruppen mit angeborener Arrhythmie, Medikamenten-induziertem Long QT Syndrom und Kontrollen bei jeweils verschiedenen Ethnitäten neun neue Varianten zu identifizieren. Diese führen zu einem Funktionsverlust des Proteins und wirken sich auf den Schweregrad der kardialen Dysfunktion umso gravierender aus, je stärker ausgeprägt der Verlust der Proteinfunktion ist.³⁸

Folglich konnten zwei Sachverhalte bekräftigt werden: einerseits der Zusammenhang zwischen Varianten im Gen für Ankyrin B und Unterschieden im zellulären Phänotyp, und andererseits die Varianten als Modulatoren für Arrhythmien.

Das QT-Intervall als Maß für die kardiale Repolarisation im Ventrikel wird nicht nur von Alter und Geschlecht, sondern auch von der Herzfrequenz beeinflusst, wie Paul A. Brink et al. zeigen konnten. (Träger der Mutation KCNQ1-A341V hatten in dieser Studie bei einer Herzfrequenz <73bpm ein signifikant niedrigeres Risiko für kardiale Ereignisse)³⁹

Es ist jedoch bekannt, dass unter anderem auch eine genetische Komponente zur Länge des individuellen QT-Intervalls beiträgt.⁴⁰ Dies wurde in Studien bereits mehrfach belegt.

Ein Zusammenhang zwischen Varianten in Genen, die man mit long-QT Syndrom in Verbindung bringt, und der Dauer des QTc-Intervalls wurde in einer kleineren Normalpopulation (141 Probanden) bereits vor zwei Jahren (2005) durch Aydin A. et al. entdeckt. Die Untersuchung von fünf long-QT Syndrom Genen (KCNE1, KCNE2, KCNQ1, SCN5A, HERG) in Hinblick auf *single nucleotide polymorphisms* erbrachte vier Varianten mit einer starken Assoziation zum QTc-Intervall, von denen zwei bis dato nicht beschrieben waren.⁴¹

Die stark vererbte Komponente der kardialen Repolarisationszeit wurde durch A. Pfeufer et al. im gleichen Jahr bestätigt. Im Sinne einer Assoziationsstudie testeten sie in der Populationsbasierten KORA-Studie bei 689 Individuen 174 SNPs in vier Kandidatengenen (KCNQ1, KCNH2, KCNE1 und KCNE2).⁴²

Ebenso wurde durch Gouas L. et al. der Einfluss von genetischen Determinanten in den Genen KCNQ1, KCNE1, KCNH2 und SCN5A auf die Länge von QTc bei gesunden Individuen belegt, was womöglich bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen einen Risikofaktor für Arrhythmien oder plötzlichen Herztod darstellt.⁴⁰

Neuere Studien belegen Zusammenhänge zwischen genetischen Varianten und der Dauer des QT-Intervalls. Z.B. wurde in der „Framingham Heart Study“ der Zusammenhang zwischen zwei genetischen Varianten im KCNH2 Lokus und der Dauer des QT-Intervalls nachgewiesen, wobei der Einfluss auf das Risiko für plötzlichen Herztod zu klären bleibt.⁴³

In einer ähnlichen Studie wurde eine Assoziation zwischen Varianten im NOS1AP Gen (NOS1AP = nitric oxide synthase 1 adaptor protein) und der Dauer des QT-Intervalls bei Probanden über 55 Jahren aufgedeckt.⁴⁴

Da die QT-Dispersion das Ausmaß der Inhomogenität der Ventrikelrepolarisation widerspiegelt³⁶, wurde in der vorliegenden Arbeit neben der QTc-Zeit auch die QT-Dispersion auf Assoziationen hin untersucht.

ANK2_4447 erbrachte auch in diesem Fall eine signifikante Assoziation (S. 54/Kapitel 3.3.2). Darüber hinaus zeigte sich zwischen ANK2_1184 und QT-Dispersion eine signifikante Assoziation (S. 53/Kapitel 3.3.2).

Es wurde bereits mehrmals erwähnt, dass Ankyrin B ein Strukturprotein ist. Darum ist im Falle eines veränderten Proteins nicht nur die Repolarisationszeit im Ventrikel von den Auswirkungen betroffen, sondern es kann auch die Herzmorphologie in Mitleidenschaft gezogen sein, d.h. es liegt womöglich eine Erweiterung des linken Ventrikels vor. Aus diesem Grund war es wichtig, neben QTc-Dauer und QT-Dispersion auch den linksventrikulären endsystolischen (und enddiastolischen) Diameter hinsichtlich möglicher Zusammenhänge mit den SNPs zu untersuchen.

Bei der statistischen Analyse lieferten die drei SNPs ANK2_0095 (S. 55/Kapitel 3.3.3), ANK2_1023 (S. 56/Kapitel 3.3.3) und ANK2_7663 (S. 56/Kapitel 3.3.3) signifikante Ergebnisse zum LVESD, was ein Hinweis für eine bestimmte Assoziation zwischen den getesteten Parametern sein kann.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass bei herzgesunden Probanden zwischen einigen SNPs im Gen für Ankyrin B und der QTc-Zeit eine gewisse Verbindung existiert.

Daneben lassen die Ergebnisse die Vermutung zu, dass QT-Dispersion und LVESD - als Parameter der kardialen Leistung - bei herzgesunden Probanden ebenfalls in einem bestimmten Ausmaß genetisch determiniert werden.

Wie schon des Öfteren verdeutlicht wurde, beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit mit dem Vergleich der Allelverteilung zwischen MONICA-Augsburg-Population und Hochrisikokollektiv.

ANK2_4447 lieferte schon bezüglich QTc und QT-Dispersion signifikante Ergebnisse. Beim Vergleich der Allelverteilung zwischen Normalbevölkerung und Hochrisikokollektiv zeigten sich vergleichsweise große Unterschiede. Betrachtet man den SNP in der MONICA-Augsburg-Population, so zeigt sich eine Verteilung von 49,2% für A und 50,8% für T (S.58/Tab. 6).

Im Gegensatz dazu fanden wir im Hochrisikokollektiv im gleichen Polymorphismus bei 52,4% ein A und bei 47,6% ein T (S. 68/Tab. 9).

Der Unterschied in der Verteilung liegt bei 3,2%. Dies ist ein hochsignifikantes Ergebnis!

Interessanterweise liegt eben dieser SNP bei den cases, also den Patienten mit Defibrillator aus dem Hochrisikokollektiv, nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (S. 63/Kapitel 3.4.1).

Der Unterschied von 3,2% weist darauf hin, dass im Hochrisikokollektiv in diesem SNP sozusagen 3,2% der Personen „fehlen“. Diese Personen erfüllen nicht die Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts.

Man könnte daraus schließen, dass sich an dieser Stelle im Genom eine Spontanmutation ereignet hat, d.h. eine nicht-stumme Mutation, die nicht repariert und anschließend der Selektion unterworfen wurde.

Um nochmals auf die Ergebnisse aus der MONICA-Population zurückzugreifen: In diesem Kollektiv aus herzgesunden Personen hatten diejenigen Probanden mit AA eine lange QTc-Dauer und diejenigen mit TT eine kurze QTc-Dauer. Gleichzeitig tritt T in dieser Population etwas häufiger auf als das Allel mit kurzer QTc, nämlich A.

Im Gegensatz dazu tritt im Hochrisikokollektiv das Allel A häufiger auf, d.h. das Allel, das zumindest bei gesunden Probanden mit einer langen QTc kombiniert ist.

Die Ergebnisse erlauben zwei unterschiedliche Sichtweisen.

1. Eine Sichtweise berücksichtigt die Erkenntnis, dass in der ischämischen Phase diejenigen mit kurzer QTc ein höheres Risiko haben für die Entwicklung von Rhythmusstörungen als Personen mit langer QTc. Daher könnte man die Tatsache, dass im genotypisierten Hochrisikokollektiv mehr Probanden mit langer QTc vorhanden sind, dadurch erklären, dass diejenigen mit kurzer QTc an ihrer Rhythmusstörung verstorben sind, bevor sie in eine Klinik eingeliefert werden konnten. Geht man davon aus, dass Probanden mit kurzer QTc durch frühzeitiges Versterben erst gar nicht in die Situation gekommen sind, eine adäquate Therapie zu erhalten, und sie folglich nicht in das genotypisierte Kollektiv aufgenommen werden konnten, so würde es sich bei der Genotypisierung des Hochrisikokollektivs auch nicht um eine repräsentative Stichprobe handeln.

2. In dem genannten Polymorphismus weicht die Häufigkeit der Allele zwischen gesunden Personen und Probanden mit Rhythmusstörung stark voneinander ab: Im Hochrisikokollektiv ist das Allel A um 3,2% häufiger vertreten als in der MONICA-Augsburg-Population. Geht

man davon aus, dass gemäß unseren Ergebnissen aus der MONICA-Augsburg-Population auch im Hochrisikokollektiv A eine lange QTc-Zeit bedeutet, so gibt es prozentual im Hochrisikokollektiv mehr Probanden mit langer QTc als in der Normalbevölkerung.

Demzufolge stellt das Allel A im SNP ANK2_4447 womöglich eine genetische Determinante für die Entwicklung von Rhythmusstörungen dar.

Zusammenfassend sprechen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde dafür, dass bestimmte genetische Varianten im Ankyrin B Gen an der Phase der kardialen Repolarisation beteiligt sind. Weiterhin scheint ein gewisser Zusammenhang zwischen genetischen Varianten und Veränderungen in der Herzmorphologie zu bestehen.

Besonders wichtig ist jedoch der hochsignifikante Unterschied in der Allelverteilung zwischen herzgesunden Personen und Personen mit struktureller, interventionsbedürftiger Herzerkrankung. Es könnte sich bei ANK2_4447 tatsächlich um einen phänotypisch-relevanten Polymorphismus handeln, bei dem das Allel A in einem gewissen Punkt die Entwicklung von Rhythmusstörungen begünstigt. In welchem Ausmaß dies der Fall ist, bleibt zu klären.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde geben Anlass zu weiterführenden genetischen Untersuchungen. Die entdeckten signifikanten SNPs im Ankyrin B Gen sollen in einem noch größeren Hochrisikokollektiv bestätigt werden. Deshalb wird zur Zeit des Verfassens dieses Textes an Kliniken in Landshut nach geeigneten Probanden gesucht, die die geforderten Kriterien erfüllen und bereit sind, ihr Blut für eine Genotypisierung im Rahmen einer Studie zur Verfügung zu stellen. Zeitgleich werden am Klinikum der Universität in Prag dieselben SNPs in einem Hochrisikokollektiv genotypisiert.

Ziel des Vorhabens ist es, das hochsignifikante Ergebnis in einer größeren Population zu bestätigen und dadurch noch aussagekräftiger zu machen.

5 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt Deutschland, <http://www.destatis.de>. Statistisches Bundesamt, statistischer Informationsdienst, Gustav-Stresemann-Ring 11, 65189 Wiesbaden
2. A. Jeron, C. Hengstenberg, S. Holmer, B. Wolnik, G.A.J. Riegger, H. Schunkert, J. Erdmann. KCNJ11 polymorphisms and sudden cardiac death in patients with acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 36 (2004) 287-293
3. Bayes de Luna A, Coumel P, Leclercq JF. Ambulatory sudden cardiac death : mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 157 cases. *Am Heart J*. 1989; 117 (1): 151-9
4. Goldberg RJ, Gore JM, Haffajee CI, Alpert JS, Dalen JE. Outcome after cardiac arrest during acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1987; 59 (4): 251-5
5. Lowel H, Lewis M, Hormann A. Prognostic significance of prehospital phase in acute myocardial infarct. Results of the Augsburg Myocardial Infarct Registry, 1985-1988. *Dtsch Med Wochenschr*. 1991 10; 116 (19): 729-33
6. Goldberg R, Szklo M, Tonascia JA, Kennedy HL. Acute myocardial infarction. Prognosis complicated by ventricular fibrillation or cardiac arrest. *JAMA*. 1979 241 (19): 2024-7
7. Steinbrunn W, Kappenberger L, Lichtlen PR. The frequency of sudden heart death in coronary heart disease. *Schweiz Med Wochenschr*. 1981; 111 (45): 1697-8
8. Michael J Ackerman. Cardiac Channelopathies: it's in the genes. *Nature Medicine*, vol.10, number 5, may 2004; p. 463-464
9. Colleen E. Clancy and Robert S. Kass. Inherited an acquired vulnerability to ventricular arrhythmias: cardiac Na⁺ and K⁺ channels. *Physiol. Review*, vol.85, January 2005; p. 33-44
10. Heiner Greten, Innere Medizin, 12. komplett überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005
11. Langes QT Syndrom (long QT syndrome; LQTS) ; http://www.medicin.uni-koeln.de/humangenetik/index_frames.html?diagnostik/herz_kreis/lqts/index.html
12. Peter J. Mohler, PH.D. Ankyrins and Human Disease: What the Electrophysiologist Should Know. *J Cardiovasc Electrophysiol*, Vol. 17, pp. 1153-1159, October 2006
13. Robert Roberts, MD, FACC. Genomics and Cardiac Arrhythmias. *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 47, No. 1, January 3, 2006: 9-21
14. Elijah R. Behr and William J McKenna. Genetic risk for acquired arrhythmia. *TREND in Genetics*, vol.19, no.9, september 2003, p. 430
15. Peter J. Mohler, Jonathan Q. Davis, Vann Bennett. Ankyrin-B coordinates the Na/K/ATPase, Na/Ca Exchanger, and InsP₃ Receptor in a cardiac T-Tubule/SR Microdomain. *PloS Biology*, december 2005, vol.3, issue 12, e423, p. 2158-2167
16. Peter J. Mohler, Jean-Jacques Schott, Anthony O. Gramolini, Keith W. Dilly, Silvia Guatimosim, William H. duBell, Long-Sheng Song, Karine Haurogné, Florence Kyndt, Mervat E. Ali, Terry B. Rogers, W.J. Lederer, Denis Escande, Herve Le Marec, Vann Bennett. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *NATURE* vol.421, 6 february 2003, p. 634-638
17. Spooner PM, Albert C, Benjamin EJ, Boineau R, Elston RC, George AL Jr, Jouven X, Kuller LH, MacCluer JW, Marban E, Muller JE, Schwartz PJ, Siscovick DS, Tracy RP, Zareba W, Zipes DP. Sudden cardiac death, genes, and arrhythmogenesis: consideration of new population and mechanistic approaches from a national heart, lung, and blood institute workshop, Part I. *Circulation*. 2001;103 (19): 2361-4
18. Spooner PM, Albert C, Benjamin EJ, Boineau R, Elston RC, George AL Jr, Jouven X, Kuller LH, MacCluer JW, Marban E, Muller JE, Schwartz PJ, Siscovick DS, Tracy RP, Zareba W, Zipes DP. Sudden cardiac death, genes, and arrhythmogenesis: consideration of new population and mechanistic approaches from a national heart, lung, and blood institute workshop, Part II. *Circulation*. 2001; 103 (20): 2447-52

19. Busjahn A, Knoblauch A, Faulhaber HD, Boeckel T, Rosenthal M, Uhlmann R, Hoehe M, Schuster H, Luft FC. QT interval is linked to 2 long-QT syndrome loci in normal subjects. *Circulation*. 1999; 99 (24): 3161-4
20. <http://genome.ucsc.edu/>
21. Schunkert H. et al. The angiotensinogen T 235 variant and the use of antihypertensive drugs in a population-based cohort. *Hypertension* 29, 628-633 (1997)
22. H.-W. Baenkler, D. Fritze, H.S. Fießl, G. Goeckenjan, C. Hamm, J. Harenberg, J. Hebe, J.H. Hengstmann, W.H. Hörl, D. Klingmüller, R. Köster, J. Küchenhoff, K.-H. Kuck, M.M. Ludwig, A. Matzdorff, C. Nienaber, U.-N. Riede, W. Rösch, G. Rudolf, H.-E. Schaefer, A. Schuchert, H.-U. Schweikert, J. Siebels, W. Terres, P. Wahl, R. Ziegler. *Duale Reihe-Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2001
23. Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*, 256. Auflage, Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York 1990
24. Prof. Dr. H. Löllgen, *Praxis der EKG-Beurteilung*. Hinweise und Leitbefunde. Boehringer Ingelheim, Pharma KG 2001, 3. überarbeitete und erweiterte Auflage
25. Robert F. Schmidt, Florian Lang. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Springer Verlag, 30. Auflage
26. Georg Löffler, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 4.korrigierte Auflage, Springer Verlag 2001, S. 356-357
27. D. Wilfingseder, H.Stoiber, Institut für Hygiene und Sozialmedizin und Ludwig-Boltzmann-Institut für AIDS-Forschung, Innsbruck. Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren; http://www.antibiotikamonitor.at/12_02/12_02_06.htm
28. Francisco M. De La Vega, Katherine D. Lazaruk, Michael D. Rhodes, Michael H. Wenz ; Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan® SNP Genotyping Assays and the SNPlex™ Genotyping System. Article in Press, DTD 5: 1-22
29. Igor V. Kutyavin, Irina A. Afonina, Alan Mills, Vladimir V. Gorn, Eugeny A. Lukhtanov, Evgeniy S. Belousov, Michael J. Singer, David K. Walburger, Sergey G. Lokhov, Alexander A. Gall, Robert Dempcy, Michael W. Reed, Rich B. Meyer and Joe Hedgpeth; 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 2000, Vol. 28, No. 2, 655-661
30. <http://www.vobs.at/gen-mol/g-popgen-2.htm>
31. <http://online-media.uni-marburg.de/biologie/genetik/boelker/vl-genetik/VLGenetik16.pdf>
32. Jan Freudenberg, Sven Cichon, Markus M. Nöthen, Peter Propping. Blockstruktur des menschlichen Genoms, Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg. 99, Heft 47, 22.November 2002, S. 3190-3195
33. Excoffier L., Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol*. 1995 Sep; 12 (5): 921-7
34. Christel Weiß. *Basiswissen Medizinische Statistik*. 3. überarbeitete Auflage, Springer Verlag
35. Michael Knapp, RE: Biased Tests for Association: Comparisons of Allele Frequencies when departing from Hardy-Weinberg Proportions. *American Journal of Epidemiology*, Vol. 154, No. 3, p. 287
36. TaqMan® SNP Genotyping Services: The quickest path to SNP genotyping answers. Applied Biosystems Integrated Laboratory Services
37. Amy R. Mank-Seymour, Jodi L. Richmond, Linda S. Wood, Jennifer M. Reynolds, Yu-Ti Fan, Gregory R. Warnes, Patrice M. Milos, John F. Thompson. Association of torsades de pointes with novel and known single nucleotide polymorphisms in long QT syndrome genes. *American Heart Journal*, December 2006, Volume 152, Issue 6, Pages 1116-1122
38. Peter J. Mohler, Solena Le Scouarnec, Isabelle Denjoy, John S. Lowe, Pascale Guicheney, Lise Caron, Iwona M. Driskell, Jean-Jacques Schott, Kris Norris, Antoine Leenhardt, Richard B. Kim, Denis Escande and Dan M. Roden. Defining the Cellular

Phenotype of “Ankyrin-B Syndrome” Variants: Human ANK2 Variants Associated With Clinical Phenotypes Display a Spectrum of Activities in Cardiomyocytes. *Circulation* 2007; 115: 432:441

39. Paul A. Brink, MD, PhD; Lia Crotti, MD; Valerie Corfield, PhD; Althea Goosen, RN; Glenda Durrheim, MSc; Paula Hedley, MSc; Marshall Heradien, MD; Gerhard Geldenhuys, PhD; Emilio Vanoli, MD; Sara Bacchini, MD; Carla Spazzolini, DVM; Andrew L. Lundquist, PhD; Dan M. Roden, MD; Alfred L. George, Jr, MD; Peter J. Schwartz, MD. Phenotypic Variability and Unusual Clinical Severity of Congenital Long-QT Syndrome in a Founder Population. *Circulation*, 2005, 112: 2602-2610
40. Gouas L., Nicaud V., Berthet M., Forhan A., Tiret L., Balkan B., Guicheney P., D.E.S.I.R. Study Group. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur J Hum Genet*. 2005 Nov; 13 (11): 1213-22
41. Aydin A., Bähring S., Dahm S., Guenther UP, Uhlmann R., Busjahn A., Luft FC. Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes. *Journal of Molecular Medicine* 2005 Feb., Volume 83 (2): 159-65
42. Arne Pfeufer, Shapour Jalilzadeh, Siegfried Perz, Jakob C. Mueller, Martin Hinterseer, Thomas Illig, Mahmut Akyol, Cornelia Huth, Andreas Schöpfer-Wendels, Bernhard Kuch, Gerhard Steinbeck, Rolf Holle, Michael Näbauer, H.-Erich Wichmann, Thomas Meitinger, Stefan Kääb. Common Variants in Myocardial Ion Channel Genes Modify the QT Interval in the General Population: Results From the KORA Study. *Circulation Research*, 2005; 96; 693-701
43. Christopher Newton-Cheh, MD, MPH; Chao-Yu Guo, PhD; Martin G. Larson, ScD; Stacy L. Musone, BA; Aarti Surti, BA; Amy L. Camargo, BA; Jared A. Drake, BA; Emelia J. Benjamin, MD, ScM; Daniel Levy, MD; Ralph B. D’Agostino, Sr, PhD; Joel N. Hirschhorn, MD, PhD^{*}; Christopher J. O’Donnell, MD, MPH^{*}. Common Genetic Variation in KCNH2 Is Associated With QT Interval Duration. *Circulation* 2007; 116: 1128-1136
44. Albert-Jan L.H.J. Aarnoudse, MD^{*}; Christopher Newton-Cheh, MD, MPH^{*}; Paul I.W. de Bakker, PhD; Sabine M.J.M. Straus, MD, PhD; Jan A. Kors, PhD; Albert Hofman, MD, PhD; André G. Uitterlinden, PhD; Jacqueline C.M. Witteman, PhD; Bruno H.C. Stricker, PhD. Common NOS1AP Variants Are Associated With a Prolonged QTc Interval in the Rotterdam Study. *Circulation* 2007; 116: 10-16

6 Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Hilfsmittel

Eppendorf-Cups:	Volumen bis 1,5mL
Ansatzröhrchen:	Volumen bis 14mL
Pipetten:	RAININ pipet·lite LTS 1000, RAININ pipet·lite LTS 200, RAININ pipet·lite LTS 100, RAININ pipet·lite LTS 0,5-10 µL (Pipetten für Volumina von 1000 µL, 200 µL, 100 µL, 10 µL)
Pipettenaufsätze:	RAININ LTS™ Tips For LTS Pipettes
Klebefolien:	ABsolute QPCR Seal Cat. #: AB-1170 Description: Optically Clear Adhesive Seal Sheets Colour: N/A Quantity: 50 Sheets ABgene House, Blenheim Road, Epsom, Surrey, KT 19 9 AP, UK. Made in UK
384er Platte:	Corning PCR 384-well plate

Plattenbezeichnung für Genotypisierung:

S III_P I-IV	MONICA-Augsburg-Population (Survey III)
S III_P V,VI,12,13	
S III_P 14-17	
S III_P 21-24	
Defi-450_1-4	Platte für Hochrisikokollektiv (<i>cases</i>)
KHK-Kontroll	KHK-Kontrollplatte (<i>controls</i>)

6.1.2 Geräte

Reagenzglasschüttler:	MERCK® eurolab: MERCK® Eurolab MELB 1719 (EU) AC 230V 50Hz 51W 100-2400 1/min Ser. No.: 070108996
Eppendorfcup-Zentrifuge:	Micro Centrifuge Model: 220VAC, Speed: 6,000 RPM Serial No. 027341, Made in Taiwan
Zentrifuge für 384er Platten:	Megafuge 1.0 von Heraeus SEPATECK Helmstr. 33, 90419 Nürnberg
Pipettierroboter:	TECAN GENESIS Freedom 150

384-1 und 384-2: (externe Cycler)	HYBAID MBS 384 S (Thermocycler?) Thermo, Electron Corporation Im Steingrund 4-6 D-63303 Dreieich
externe Cycler: (nur Genotypisierung Defi 450_1-4 und Kontroll KHK 485-488)	AB Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700, Serial No. 384S4071504, Made in Singapore
Taqman:	Taqman® von AB Applied Biosystems, ABI PRISM Instrumentenpass: Typ: SDS 7900 S/N: 201121 Installationsdatum: 27.08.2003 AB Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH Brunnenweg 1 64331 Weiterstadt

6.1.3 Chemikalien

Master Mix: (Genotypisierung Survey III)	2 x PCR Master Mix for Probe Assays (5mM final MgCl ₂) – No UNG or dUTP Lot 18/28 oder 19/4 (nicht mischen) EGT Group, http://www.eurogentec.com
Master Mix: (Genotypisierung Defi 450_1-4 Genotypisierung Kontroll KHK 485-488)	Applied Biosystems Taqman® 2 x Universal PCR MasterMix 2000 Reactions (50mL) Lot No. H0233958004002-01
Assays on Demand:	Applied Biosystems
H ₂ O:	Aqua ad iniectionabilia Braun; Lösungsmittel zur Herstellung von Parenteralia, zur Rekonstitution bzw. zur Verdünnung von Parenteralia 100mL Flüssigkeit enthalten: Wasser für Injektionszwecke Steril und frei von Bakterien-Endotoxinen B. Braun Melsungen AG D-34209 Melsungen

6.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.2.1 Abbildungen

	Seite
Abbildung 1: EKG-Kurve ¹⁰	8
Abbildung 2: Mechanismus bei veränderter Aktivität des Ankyrin B.....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der genomischen Region am Ankyrin 2 im UCSC genome browser ²⁰	16
Abbildung 4: Oberflächen-EKG zur Erläuterung der QT-Dispersion	19
Abbildung 5: Altersverteilung in der Gruppe der <i>cases</i>	21
Abbildung 6: Altersverteilung in der Gruppe der <i>controls</i>	21
Abbildung 7: Geschlechterverteilung in den <i>cases</i> und <i>controls</i>	22
Abbildung 8: polymerase chain reacion (PCR) ²⁶	29
Abbildung 9: Darstellung der PCR mit dem Programm SDS 2.2.....	30
Abbildung 10: DNA-Strang, Primer, Oligonukleotid TaqMan Probe mit Reporter, Quencher und MGB ²⁸	31
Abbildung 11: Abspaltung des <i>reporters</i> VIC (match) ²⁸	33
Abbildung 12: mismatch ²⁸	33
Abbildung 13: Abspaltung des <i>reporters</i> FAM (match) ²⁸	33
Abbildung 14: mismatch ²⁸	33
Abbildung 15: Darstellung der allelischen Diskriminierung im Programm SDS 2.2	35
Abbildung 16: VIC-Signal	36
Abbildung 17: BOTH-Signal	36
Abbildung 18: FAM-Signal.....	37
Abbildung 19: manuelles Zuordnen der beiden „Undetermined“ zu BOTH und VIC.....	38
Abbildung 20: Kopplungsungleichgewicht D' in der MONICA-Augsburg-Population.....	46
Abbildung 21: 17 SNPs und p-Werte	47
Abbildung 22: signifikante p-Werte	48
Abbildung 23: QTc_ANK2_MONI_SNPs	49
Abbildung 24: QTc_ANK2_MONI_2erHaplo.....	49
Abbildung 25: ANK2_0095 mit QTc	50
Abbildung 26: ANK_0954 mit QTc	51
Abbildung 27: ANK2_4189 mit QTc	51
Abbildung 28: ANK2_4447 mit QTc	52
Abbildung 29: ANK2_1184 mit QT-Dispersion	53
Abbildung 30: ANK2_4447 mit QT-Dispersion	54
Abbildung 31: Assoziation LVESD	55
Abbildung 32: ANK2_0095 und lvesd	55
Abbildung 33: ANK2_1023 und lvesd	56
Abbildung 34: ANK2_7663 und lvesd	56
Abbildung 35: Verteilung von seltenem und häufigem Allel in den einzelnen SNPs	59
Abbildung 36: Kopplungsungleichgewicht für die sechs im Hochrisikokollektiv untersuchten SNPs	62
Abbildung 37: Vergleich mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	63
Abbildung 38: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_0095 in der Gruppe der <i>cases</i> und in der Gruppe der <i>controls</i>	64
Abbildung 39: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_1005 in der Gruppe der <i>cases</i> und in der Gruppe der <i>controls</i>	64
Abbildung 40: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_1185 in der Gruppe der <i>cases</i> und in der Gruppe der <i>controls</i>	65
Abbildung 41: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_4184 in der Gruppe der <i>cases</i> und in der Gruppe der <i>controls</i>	65
Abbildung 42: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_8375 in der Gruppe der <i>cases</i> und in der Gruppe der <i>controls</i>	66
Abbildung 43: Verteilung der Genotypen im SNP ANK2_4447 in der Gruppe der <i>cases</i> und in der Gruppe der <i>controls</i>	66

6.2.2 Tabellen

Tabelle 1: Verschiedene LQTS, Genompositionen, defekte Gene und betroffene Ionenkanäle.....	9
Tabelle 2: Parameter der MONICA-Augsburg-Population	18
Tabelle 3: Parameter der Hochrisikopopulation	20
Tabelle 4: Ejektionsfraktion	20
Tabelle 5: verwendete Software und web-tools.....	44
Tabelle 6: Verteilung der Allele in der MONICA-Augsburg-Population	58
Tabelle 7: ANK2_4447 und Quartile.....	60
Tabelle 8: Assoziation ANK2_ICD	67
Tabelle 9: Verteilung der Allele im Hochrisikokollektiv.....	68

6.3 Assays

rs-Nummer	Chr4_hg17	Assay-Name		rs-Nummer	Chr4_hg17	Assay-Name
rs29322	114574299	ANK2_0095		rs4834330	114647514	ANK2_4184
rs29308	114585889	ANK2_0954		rs11940206	114607501	ANK2_4189
rs362498	114513721	ANK2_1005		rs10433900	114319415	ANK2_4405
rs13118200	114481969	ANK2_1021		rs1979086	114095141	ANK2_4447
rs6533673	114480483	ANK2_1023		rs2285711	114474884	ANK2_7663
rs313960	114410026	ANK2_1184		rs313979	114339381	ANK2_8303
rs413019	114436731	ANK2_1185		rs1385662	114384123	ANK2_8375
rs404950	114443846	ANK2_2198		rs13101559	114400482	ANK2_8405
rs12508397	114666887	ANK2_4162				

6.4 Liste der Abkürzungen

ACVB	Aorto Coronarer Venen Bypass
BMI	Body mass index
b.p.m.	beats per minute
DCM	Dilatative Cardiomyopathie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
EKG	Elektrokardiogramm
FRET	fluorescent resonance energy transfer
ICD	implantable cardioverter defibrillator
InsP ₃ R	Inositol-1,4,5-Trisphosphatrezeptor
KHK	Koronare Herzkrankheit
LD	linkage disequilibrium
LQTS	long-QT-Syndrom
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Diameter
MGB	minor groove binder
Na / K ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NCX 1	Natrium-Calcium-Austauscher
NFQ	Nicht-fluoreszierender Quencher
NTC	no-template control
NYHA	New York Heart Association
PCR	polymerase chain reaction
QTc	korrigierte QT-Zeit
RR	Blutdruck (Riva Rocci)
SNP	single nucleotide polymorphism
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

6.5 URLs

Name	Art	Anwendung
SPSS 12.0 für Windows	Allgemeine statistische Software	Assoziationstests für MONICA-Augsburg-Population
Helixtree	Statistische Software für Assoziationsanalysen	Assoziationstests für beide Populationen
SDS 2.2	Zuordnung von Genotypen	Allelische Diskriminierung
http://www.hapmap.org/	International HapMap project	LD-Struktur genomweit
http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/	Assoziation und LD-Bestimmung	Bestimmung der LD-Struktur der MONICA-Augsburg-Population
http://genome.ucsc.edu/	UCSC Genome browser	Darstellung im genomischen Kontext
http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl	Web-tool zur Assoziationsberechnung	Berechnung der Quartile und Quintile für ANK2_4447 im Hochrisikokollektiv

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Berger
Vorname	Iris
Geburtsdatum/-ort	28.01.1982 in Regensburg
Anschrift	Galgenberg-West 21, 93109 Wiesent
Familienstand	ledig
Familie	Mutter Monika Berger, geb. 10.06.1953 Vater Dr. med. Albert Berger, geb. 08.11.1950, verst. 30.07.1995 Schwester Christine Berger, geb. 31.01.1980 Bruder Wolfgang Berger, geb. 20.06.1984

Schulbildung

09/1988-07/1992	Grundschule Wiesent
09/1992-06/2001	Gymnasium Neutraubling
06/2001	Abitur

Studium Humanmedizin

10/2001-03/2004	Vorklinischer Studienabschnitt
03/2004	Physikum
03/2004-01/2007	Klinischer Studienabschnitt
02/2007-01/2008	Praktisches Jahr
14./15./16.04.2008	Schriftlicher Teil der Ärztlichen Prüfung
19./20.05.2008	Mündlich-praktischer Teil der Ärztlichen Prüfung

8 Danksagung

Ich möchte allen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben, meinen großen Dank aussprechen.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. G. A. J. Riegger danken, der mir die Möglichkeit gab, die Arbeit in der Klinik für Innere Medizin II der Universität Regensburg durchzuführen. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass mir im H1 José Carreras Forschungsgebäude für die praktischen Arbeiten ein Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt wurde.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. A. Jeron möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken. Von Anfang bis Ende der Dissertation stand er mir beratend und helfend zur Seite. Das angenehme Arbeitsklima während unserer Besprechungen hat sich positiv auf das Entstehen dieses Manuskriptes ausgewirkt.

Dank gebührt auch meinem Betreuer Herrn Dr. med. K. Sedlacek. Er war es, der mich in die Thematik eingeführt und mir wertvolle Kenntnisse auf den Gebieten der Genetik und der Statistik vermittelt hat. Nach seinem Umzug nach Tschechien war er trotzdem als Berater und Ideengeber behilflich.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. K. Stark bedanken. Bei sämtlichen Unklarheiten, die bezüglich der methodischen Hintergründe auftauchten, war er als Ansprechpartner unentbehrlich und hat durch sein Fachwissen das Vorankommen in dieser Arbeit unterstützt.

Ebenso möchte ich Frau Martina Köhler dafür danken, dass sie mich in die grundlegende Arbeitsweise der Genotypisierung mittels TaqMan® eingeführt und bei Problemen geduldig geholfen hat. Auch Herr Josef Simon war bei Fragen stets behilflich.

Zusammenfassend hat das freundliche Team im José Carreras Forschungsgebäude bei der praktischen Laborarbeit zu einer kollegialen Atmosphäre beigetragen.

Einen großen Dank schulde ich meinem Partner Tim Erdmann. Er hat während der schriftlichen Ausarbeitung bei sehr vielen Computer-technischen Problemen geduldig und ausdauernd geholfen. Durch zahlreiche Tipps und Erklärungen hat er bei der grafischen Verschönerung der Dissertation mitgewirkt.

Meinem Bruder möchte ich an dieser Stelle für die fruchtbaren Hinweise danken, die er bei der Korrektur des Skripts gegeben hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und ganz besonders bei meiner Mutter bedanken. Ohne ihre Unterstützung hätte ich viele Dinge in meinem Leben nicht erreicht. Sie war es, die mir stets in allen Lebenslagen verlässlich zur Seite stand und bei der Durchführung dieser Dissertation während mancher Durststrecke aufmunternde Worte fand.

9 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Universität Regensburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Assoziation des QTc-Intervalls und anderer EKG-Parameter mit Polymorphismen
im Ankyrin B Gen in der MONICA-Augsburg-Population verglichen mit Polymorphismen
im Ankyrin B Gen in einem Hochrisikokollektiv

in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. G. A. J. Riegger ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Mittel benutzt habe.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand im José Carreras Forschungsgebäude am Klinikum der Universität Regensburg unter der Leitung von Herrn Dr. rer. nat. Klaus Stark.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Regensburg, 13. Februar 2008

Iris Berger